



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RELEVÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA C REACTIVA EM CIRURGIA –
ESTUDO PRELIMINAR NO CÃO

CATARINA CORREIA AFONSO ARCHER

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor Carlos Martins
Professora Doutora Cristina Lobo Vilela
Professor Doutor José Limão Oliveira
Dra. Maria João Dinis da Fonseca

ORIENTADORA

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADORA

Professora Doutora Cristina Lobo Vilela

2008

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RELEVÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA C REACTIVA EM CIRURGIA –
ESTUDO PRELIMINAR NO CÃO

CATARINA CORREIA AFONSO ARCHER

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor Carlos Martins
Professora Doutora Cristina Lobo Vilela
Professor Doutor José Limão Oliveira
Dra. Maria João Fonseca

ORIENTADORA

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADORA

Professora Doutora Cristina Lobo Vilela

2008

LISBOA

Agradecimentos

Ao terminar este estágio curricular, gostaria de começar por agradecer aos que me incentivaram e apoiaram ao longo destes seis meses e foram determinantes para manter o ânimo e entusiasmo necessários à sua conclusão.

Começaria pelas minhas orientadoras, Dra. Maria João Fonseca e Professora Doutora Cristina Vilela por todo o apoio e paciência manifestadas no acompanhamento, execução e revisão desta tese, sobretudo naqueles momentos em que o trabalho parecia não ter continuação nem saída.

Igualmente a todo o corpo clínico do Hospital Veterinário do Restelo – Dr. Jorge Cid, Dra. Elisabete Capitão, Dra. Paula Santos, Dra. Rita Bonhorst, Dra. Marina Coelho, Dra. Maria Andrade, Dra. Rita Figueiredo, Dr. Joel Silva, Dr. Miguel Ramos, Dra. Ana Valença, Dr. Marco Simões, Dr. Hugo Pereira, Dr. Miguel Malheiro, Dr. Nuno Leite, Dra. Diogo Magno, Dra. Marta Cipriano, Dra. Joana Crisóstomo e Dr. Ribeiro Alves – o meu obrigada pela confiança, disponibilidade e paciência demonstradas durante todo o período de estágio e sem os quais a realização dos estudos clínicos não teria sido possível. Este agradecimento é igualmente extensível às auxiliares do Hospital.

À Dra. Ângela Xufre por toda a disponibilidade e empenho na realização dos protocolos laboratoriais para a determinação da proteína C reactiva.

E por último uma palavra especial à minha família e aos meus amigos por manterem inabalável o seu suporte desde o início do meu percurso académico.

Não posso deixar igualmente de referir e agradecer aos que com o seu prestimoso apoio financeiro foram determinantes para a escolha, realização e conclusão desta tese, agradecendo especialmente a:

- Hospital Veterinário do Restelo;
- Laboratório DNAtch;
- Sanifauna – Produtos Veterinários;
- Royal Canin

A expressão “resposta de fase aguda” refere-se a uma resposta inflamatória do organismo a qualquer alteração tissular. O objectivo desta resposta é a prevenção do desenvolvimento de mais lesões, limitar o crescimento de microorganismos, remover moléculas prejudiciais e activar determinados mecanismos para que o organismo possa retomar a homeostase. Esta resposta caracteriza-se por sinais inflamatórios sistémicos, resultantes de alterações endócrinas, hematológicas, imunológicas, metabólicas e neurológicas e por uma alteração das concentrações de algumas proteínas sintetizadas pelo fígado, denominadas proteínas de fase aguda. Na espécie canídea, entre os diferentes tipos de proteínas de fase agudas existentes, a proteína C reactiva é a que apresenta maior significado.

A proteína C reactiva foi a primeira proteína de fase aguda a ser caracterizada ao verificar-se a sua capacidade de se ligar ao polissacarídeo C das bactérias Gram+. Pertence à família das pentraxinas, uma vez que apresenta uma estrutura pentamérica. A sua síntese ocorre no fígado como resposta à libertação de mediadores locais de inflamação, atingindo um pico às 24-48 horas após um estímulo inflamatório. As suas principais funções são a fixação a ligandos, tais como fosfocolina, lecitina e esfingomiélin, activação da via clássica do complemento, da fagocitose, contribuindo para a eliminação de detritos celulares e protecção contra infecções, protecção de vasos e acção anti-neoplásica. Existem diversos métodos para a sua detecção, sendo a imunoturbidimetria, ELISA e a imunocromatografia, os métodos disponíveis para a prática clínica. A idade, a gestação e a administração de fármacos podem levar a alterações na sua concentração.

Os dois estudos clínicos efectuados confirmaram (i) a ausência de reacções cruzadas entre a proteína C reactiva canina e a sua homóloga humana e (ii) que as concentrações de proteína C reactiva aumentam após uma intervenção cirúrgica de acordo com a intensidade do trauma cirúrgico. Embora a determinação de proteína C reactiva não se tenha revelado de grande utilidade na prática clínica quando determinada 24 horas após a cirurgia, é necessário realizar estudos cinéticos a tempos mais alargados para averiguar a sua relevância.

Uma vez que as concentrações de proteína C reactiva se encontram aumentadas na presença de infecção, lesão tissular, trauma, cirurgia, neoplasia ou alterações inflamatórias, a sua determinação pode ser útil na avaliação da presença, extensão e gravidade de certas alterações orgânicas, contribuindo para o diagnóstico diferencial, para a verificação da eficácia de um tratamento, e com propósitos de prognóstico, uma vez que a duração e magnitude da resposta reflecte a gravidade da doença.

Palavras-chave: proteína C reactiva, cão, cirurgia.

Abstract

The expression of “acute phase response” refers to an inflammatory response of the organism to any tissue alteration. The purpose of this response is to prevent the further development of lesions, to limit the microorganism’s increase, to remove harmful molecules and to specific mechanisms that allow the organism to return to homeostasis. This response is characterized by inflammatory signs following endocrinous, hematologic, immunologic, metabolic and neurologic changes and by a modification of some liver proteins concentration, the acute phase proteins. In the dog, C-reactive protein is the most significant protein amongst the different types of existing acute phase proteins.

C-reactive protein was the first acute phase protein to be characterized when testing its binding ability to C polysaccharide of Gram+ bacteria. It belongs to the pentraxin family, because of its pentameric structure. It is synthesized in the liver, triggered by local inflammatory mediators, reaching a peak at 24-48 hours after an inflammatory stimulus. Its main functions are binding to ligands, such as phosphocoline, lecithin and sphingomyelin, activation of the classic pathway of the complement and of phagocytosis, through contributing to cellular debris elimination, protection against infections, vascular protection and anti-neoplastic action. There are several methods available for its detection, being immunoturbidimetry, ELISA and immunocromatography the more frequently used. Individual differences in age, pregnancy and ongoing medication may lead to concentration changes.

The two clinical studies confirmed (i) the absence of crossed reactivity between canine C-reactive protein and the human homologous and (ii) that serum concentration increases after surgery according to the severity of the surgery trauma. Although it was not possible to show a clinical relevance for the C-reactive protein determination 24 hours after surgery, kinetic studies should be performed in order to better evaluate its importance.

Since its concentrations increase in cases of infection, tissue damage, trauma, surgery, neoplastic growth or inflammatory disorders, the quantification of C-reactive protein may be helpful to detect and evaluate the extension and severity of certain changes, contributing to the differential diagnosis and to fundament a prognosis, as the duration and magnitude of the response reflects the illness severity.

Keywords: C-reactive protein, dog, surgery

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice geral	iv
Índice de tabelas	vi
Índice de figuras	vi
Índice de gráficos	vii
Índice de abreviaturas e símbolos	viii
Introdução	1
Descrição das actividades de estágio	3
1. Casuística observada	3
1.1. Casuística observada na área da clínica médica.....	3
1.2. Casuística observada nos meios complementares de diagnóstico.....	5
1.3. Casuística observada na área da clínica cirúrgica.....	6
Monografia	8
1. Resposta de fase aguda	8
2. Proteínas de fase aguda	9
3. Proteína C Reactiva	11
3.1. História de PCR.....	11
3.2. Estrutura e caracterização de PCR.....	11
3.3. Síntese de PCR.....	12
3.3.1. Mediadores de inflamação.....	13
3.3.2. Síntese hepática de PCR.....	15
3.4. Proteína C reactiva em diferentes espécies animais.....	16
3.5. Antigenicidade de PCR.....	17
3.6. Função de PCR.....	18
3.6.1. Fixação a ligandos.....	18
3.6.2. Activação da via clássica do sistema do complemento.....	19
3.6.3. Fagocitose.....	20
3.6.4. Eliminação de detritos celulares.....	20
3.6.5. Protecção contra infecções.....	21
3.6.6. Protecção dos vasos.....	21
3.6.7. Acção anti-neoplásica.....	21
3.7. Detecção de PCR.....	22
3.7.1. Imunodifusão.....	23
3.7.2. Electro-imuno-ensaio.....	23
3.7.3. ELISA.....	23
3.7.4. Imunoturbidimetria.....	24

3.7.5. CRPLA	24
3.7.6. Imunocromatografia	24
3.8. Comparação com outros marcadores de inflamação	24
3.9. Variações biológicas de PCR	25
3.9.1 Valores normais	25
3.9.2. Variações fisiológicas	26
3.9.2.1. Idade	26
3.9.2.2. Género	26
3.9.2.3. Ritmo circadiano.....	27
3.9.2.4. Gestação	27
3.9.2.5. Tipo de vida.....	28
3.9.2.6. Influência dos medicamentos.....	28
3.10. Variações patológicas de PCR.....	29
3.11. PCR como parâmetro laboratorial	31
4. Ausência de reacção cruzada entre PCR canina e PCR humana	34
4.1 Introdução.....	34
4.2 Materiais e métodos	35
4.2.1. Animais	35
4.2.2. Análises hematológicas	37
4.2.3. Recolha de amostras para quantificação de PCR.....	37
4.2.4. Técnica de análise	38
4.3. Resultados.....	38
4.3.1. Análises hematológicas	38
4.3.2. Valores da proteína C reactiva	39
4.4. Discussão	40
5. Alterações da proteína C reactiva sérica em cães sujeitos a intervenções cirúrgicas	42
5.1. Introdução.....	42
5.2. Materiais e métodos	43
5.2.1. Animais	43
5.2.2. Análises hematológicas	45
5.2.3. Recolha de amostras para quantificação de PCR.....	45
5.2.4. Técnica de análise	45
5.3. Resultados.....	46
5.3.1. Análises hematológicas	46
5.3.2. Valores da proteína C reactiva	47
5.4. Discussão	49
Conclusão	53
Bibliografia	55
Anexo 1.....	63
Anexo 2.....	74
Anexo 3.....	75
Anexo 4.....	76
Anexo 5.....	81
Anexo 6.....	82

Índice de tabelas

Tabela 1: Clínica médica – percentagem relativa das espécies animais observadas	3
Tabela 2: Clínica médica – percentagem relativa do género das espécies canina e felina	3
Tabela 3: Clínica médica - percentagem relativa dos animais exóticos observados	4
Tabela 4: Clínica médica - percentagem relativa das consultas observadas	4
Tabela 5: Percentagem relativa das consultas observadas na área da patologia clínica	4
Tabela 6: Percentagem relativa das consultas de imunoprofilaxia	5
Tabela 7: Percentagem relativa das consultas de tratamento e reavaliação	5
Tabela 8: Percentagem relativa dos meios complementares de diagnóstico observados	6
Tabela 9: Percentagem relativa dos diferentes tipos de cirurgias observados	6
Tabela 10: Percentagem relativa das pequenas cirurgias	7
Tabela 11: Percentagem relativa das cirurgias de tecidos moles	7
Tabela 12: Características e valores da proteína C Reactiva em diferentes espécies animais	17
Tabela 13: Valores da proteína C reactiva em 304 cães saudáveis, de diferentes raças, em função do género	27
Tabela 14: Género, idade, raça, tipo de cirurgia e outras alterações dos animais utilizados para o estudo clínico	36
Tabela 15: Género, idade, raça, tipo de cirurgia e outras alterações dos animais utilizados para o estudo clínico	43
Tabela 16: Relação das concentrações séricas de PCR com as análises hematológicas e bioquímicas para cada animal sujeito a uma intervenção cirúrgica.	48
Tabela 17: Valores do hemograma e bioquímicas de rotina referentes aos animais do primeiro estudo clínico	74
Tabela 18: Concentrações séricas da proteína C reactiva nos animais do 1º estudo clínico	75
Tabela 19: Valores do hemograma e bioquímicas de rotina referentes aos animais do segundo estudo clínico	81
Tabela 20: Concentrações séricas da proteína C reactiva nos animais do 2º estudo clínico	82

Índice de figuras

Figura 1: Características padrão de alterações nas concentrações de algumas proteínas de fase aguda, depois de um estímulo inflamatório	10
Figura 2: Activação do sistema do complemento pela via clássica pela proteína C reactiva	20
Figura 3: representação esquemática da reacção de antigenicidade entre os anticorpos anti-PCR humana e a PCR canina	35

Índice de gráficos

Gráfico 1: Valores obtidos no hemograma realizados nos animais em estudo.....	38
Gráfico 2: Valores obtidos nas bioquímicas realizadas nos animais em estudo.....	39
Gráfico 3: Variação da concentração de PCR no animal 1	39
Gráfico 4: Variação da concentração de PCR no animal 2	39
Gráfico 5: Variação da concentração de PCR no animal 3	39
Gráfico 6: Variação da concentração de PCR no animal 4	39
Gráfico 7: Variação da concentração de PCR no animal 5	39
Gráfico 8: Variação da concentração de PCR no animal 6	39
Gráfico 9: Variação da concentração de PCR no animal 7	39
Gráfico 10: Variação da concentração de PCR no animal 8	39
Gráfico 11: Variação da concentração de PCR no animal 9	39
Gráfico 12: Variação da concentração de PCR no animal 10	40
Gráfico 13: Variação da concentração de PCR no animal 11	40
Gráfico 14: Variação da concentração de PCR no animal 12	40
Gráfico 15: Variação da concentração de PCR no animal 13	40
Gráfico 16: Variação da concentração de PCR no animal 14	40
Gráfico 17: Variação da concentração de PCR no animal 15	40
Gráfico 18: Valores obtidos no hemograma realizado nos animais em estudo	46
Gráfico 19: Valores obtidos nas bioquímicas realizadas nos animais em estudo.....	46
Gráfico 20: Variações de PCR antes (T_0) e 24 horas depois da cirurgia (T_1) nos animais em estudo	47

Índice de abreviaturas e símbolos

HVR	Hospital Veterinário do Restelo
%	percentagem
PAAF	punção aspirativa com agulha fina
LDL	lipoproteína de baixa densidade
HDL	lipoproteína de alta densidade
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
µg/ml	micrograma por mililitro
SDS-PAGE	electroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulphate-poly acrylamide gel electrophoresis</i>))
IL	interleuquina
Phe	fenilalanina
Glu	ácido glutâmico
C1q	subcomponente do componente 1
FcγR	receptor Fcγ (<i>fragment crystallizable gamma receptor</i>)
PCR	proteína C reactiva
Asp	ácido aspartâmico
Tyr	tirosina
PAS	ácido periódico-Schiff
pH	potencial hidrogeniónico
TNF	factor de necrose tumoral
IFN	interferon
PFA	proteína de fase aguda
µg/kg	micrograma por quilograma
gp	glicoproteína
RNA	ácido ribonucleico
STAT	sinal transductor e activador de transcrição (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
Rel-NFκB	<i>ren/nuclear factor-κB</i>
LPS	lipopolissacarídeo
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
IgG	imunoglobulina G
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
°C	graus Celsius
PAF	factor activador de plaquetas

CRPLA	capillary reversed passive latex agglutination
nm	nanometro
mg/L	miligramas por litro
µm	micrómetro
ml	mililitro
SIRS	síndrome de resposta inflamatória sistémica
ALB	albumina
SAA	proteína amilóide A sérica
HP	haptoglobina
CP	ceruloplasmina
OVH	ovariohisterectomia
L6-L7	6 ^a e 7 ^a vértebra lombar
µL	microlitro
cg/dl	centigramas por decilitro
mg/dl	miligramas por decilitro
ALP	fosfatase alcalina
ALT	alanina transaminase
UI/L	unidades internacionais por litro
dg/dl	decigramas por decilitro
CE	corpo estranho
GB	glóbulos brancos
GV	glóbulos vermelhos
PLA	plaquetas
BUN	ureia nitrogenada sanguínea (<i>blood urea nitrogen</i>)
CREA	creatinina
PT	proteínas totais
GLU	glucose
IR	insuficiência renal
AH	alterações hepáticas

Introdução

De acordo com o novo processo de Bolonha, para terminar o curso com o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, é necessário a realização de um estágio curricular e de uma dissertação sobre um tema específico.

Realizei o estágio no Hospital Veterinário do Restelo, na área de clínica e de cirurgia de animais de companhia, sob a orientação científica da Dra. Maria João Fonseca. Os seus objectivos principais foram a aplicação prática dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso e a aquisição de novos conhecimentos, preparando-me para a vida profissional.

No Hospital do Restelo foi-me atribuído um horário rotativo diário, que abrangia períodos diurnos, nocturnos, fins-de-semana e feriados, de modo a possibilitar o acompanhamento de todo o tipo de situações clínicas, incluindo urgências médicas e cirúrgicas. Durante os diferentes horários, participei em três actividades distintas: consultas, cirurgia e internamento. Nas consultas, que incluíram diferentes especialidades, acompanhei o médico veterinário na realização da história pregressa, do exame clínico e de provas diagnósticas, de forma a chegar a um diagnóstico. Ao longo do período de estágio, foi-me possível realizar todas estas etapas comunicando, depois, ao médico veterinário as informações recolhidas. O internamento, que se encontra dividido em internamento de cães, gatos, exóticos e animais com doenças infecto-contagiosas, foi o local onde pude acompanhar mais de perto cada caso, monitorizando cada animal, administrando a medicação necessária e realizando os exames complementares necessários. Por último, na área de cirurgia, tive a oportunidade de fazer o acompanhamento pré-cirúrgico, cirúrgico ou pós-cirúrgico de cada paciente. Para isso, realizei exames pré-cirúrgicos e pré-anestésicos, administração da pré-medicação e da anestesia, monitorização anestésica, auxílio durante a cirurgia e acompanhamento do animal no período pós-cirúrgico. Os exames complementares de diagnóstico são comuns às três actividades e incluem radiografia, ecografia, análises clínicas, electrocardiograma, entre outros.

Durante o período de estágio foi-me possível contactar com diferentes situações clínicas, tendo tido a oportunidade de participar nas variadas e numerosas actividades que envolvem a medicina veterinária, e tendo ainda apresentado diversos trabalhos, entre os quais uma revisão dos conhecimentos actuais sobre a aplicação prática da determinação dos valores de proteína C reactiva em intervenções cirúrgicas; esta apresentação suscitou-me a ideia e a curiosidade de aprofundar os conhecimentos desta proteína e sua relevância em medicina veterinária, uma vez que a mesma tem grande importância em medicina humana.

Assim decidi escolher para tema da minha monografia de mestrado integrado: “Relevância da determinação de proteína C reactiva em cirurgia – estudo preliminar no cão”.

A presente dissertação está dividida em duas partes. Inicialmente é apresentado um resumo da casuística observada durante o período de estágio, que decorreu de 3 de Setembro de 2007 a 29 de Fevereiro de 2008, excedendo largamente as 500 horas previstas no regulamento. A segunda parte inclui uma monografia sobre a proteína C reactiva que tem por objectivo realizar um estudo aprofundado sobre o comportamento da proteína C reactiva em situações cirúrgicas, de forma a melhor compreender e avaliar a relevância da sua quantificação em medicina veterinária. Esta parte está, por sua vez, dividida em dois capítulos. O primeiro compreende uma revisão bibliográfica, onde são descritas as características gerais, funções e aplicações da quantificação desta proteína na espécie canina. O segundo corresponde à realização de uma avaliação preliminar da relevância da informação que se pode retirar da quantificação de proteína C reactiva em animais submetidos a diferentes tipos de intervenções cirúrgicas, seguidas durante o período de estágio.

Descrição das actividades de estágio

1. Casuística observada

A apresentação estatística da actividade clínica desenvolvida encontra-se dividida em três áreas: clínica médica, meios complementares de diagnóstico e clínica cirúrgica. Em cada uma destas secções será apresentada a respectiva casuística, sob a forma de análise percentual.

1.1. Casuística observada na área da clínica médica

De entre os animais que compareceram às consultas, a espécie canina foi a que apresentou maior prevalência, seguida da felina e dos animais exóticos (Tabela 1).

Tabela 1: Clínica médica – percentagem relativa das espécies animais observadas

Animais	Percentagem
Cães	63%
Gatos	33%
Exóticos	4%

Tanto na espécie canídea, como na felina, foram observados mais machos do que fêmeas (Tabela 2). Nos animais exóticos destacam-se os lagomorfos relativamente às aves (papagaio, caturras e periquitos), aos roedores (hamsters, chinchilas e porcos da índia) e aos répteis (tartarugas) (Tabela 3).

Tabela 2: Clínica médica – percentagem relativa do género das espécies canina e felina

Animais	Género	Percentagem
Cães	Machos	56%
	Fêmeas	44%
Gatos	Machos	55%
	Fêmeas	45%

Tabela 3: Clínica médica - percentagem relativa dos animais exóticos observados

Animais	Percentagem
Lagomorfos	41%
Aves	27%
Roedores	27%
Répteis	5%

Durante o estágio, assistimos a diferentes tipos de consultas, que se dividiram em consultas de patologia clínica, imunoprofilaxia e outras intervenções que incluem tratamentos e reavaliações (Tabela 4). Como seria de esperar, a patologia clínica concentrou a maior parte dos animais que se apresentaram à consulta, uma vez que o HVR (Hospital Veterinário do Restelo) é uma referência em diversas especialidades clínicas. Deve-se ter em conta que há animais que se apresentaram aos três tipos de consultas.

Tabela 4: Clínica médica - percentagem relativa das consultas observadas

Consultas	Percentagem
Patologia clínica	70%
Tratamento/reavaliação	21%
Imunoprofilaxia	9%

Dentro da patologia clínica (Tabela 5) existem diferentes especialidades, onde as mais acompanhadas na espécie canídea foram as de gastroenterologia e, na espécie felina as de nefrologia e urologia. É de salientar que cada animal pode apresentar mais do que uma patologia, sendo por isso observado em mais do que uma especialidade.

Tabela 5: Percentagem relativa das consultas observadas na área da patologia clínica

Patologia clínica	Percentagem	Patologia clínica	Percentagem
Gastroenterologia	18%	Reprodução	5%
Nefrologia/urologia	14%	Neurologia	4%
Dermatologia	12%	Endocrinologia	4%
Hematologia/Infecciosas	10%	Toxicologia	4%
Cardiologia	8%	Oftalmologia	3%
Pneumologia	8%	Estomatologia	2%
Oncologia	6%	Outros	2%

A medicina preventiva constitui uma importante área de actuação na clínica de animais de companhia por combater a dispersão de agentes infecciosos. As consultas de imunoprofilaxia foram observadas em todos os tipos de animais, com maior incidência na espécie canídea (Tabela 6). Dentro do grupo dos animais exóticos só se observaram vacinas nos lagomorfos.

Tabela 6: Percentagem relativa das consultas de imunoprofilaxia

Animais	Percentagem
Cães	66%
Gatos	29%
Lagomorfos	5%

As consultas de tratamento e reavaliação (Tabela 7) incluíram a revisão ou tratamento dos animais após intervenções cirúrgicas ou consultas prévias. Neste grupo também se incluem algumas intervenções que não foram realizadas durante a consulta propriamente dita, mas que estão relacionadas com ela, como por exemplo as necrópsias, transfusões e eutanásias.

Tabela 7: Percentagem relativa das consultas de tratamento e reavaliação

Tipo de intervenção	Percentagem
Pensos	43%
Remoção de pontos/agrafos	16%
Algáliação	10%
Fluidoterapia subcutânea	10%
Eutanásia	10%
Necrópsia	6%
Transfusão	5%

1.2. Casuística observada nos meios complementares de diagnóstico

Os exames complementares são muitas vezes imprescindíveis para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo e para a monitorização de um paciente em tratamento. A tabela 8 apresenta um resumo dos exames complementares realizados durante o período de estágio. Embora grande parte dos meios de diagnósticos sejam realizados no hospital, algumas análises ou procedimentos têm de ser enviados para laboratórios especializados

que trabalham em colaboração com o mesmo. Deve ter-se em conta que o mesmo animal pode ser sujeito a diferentes exames complementares de diagnóstico.

Tabela 8: Percentagem relativa dos meios complementares de diagnóstico observados

Exames complementares de diagnóstico	Percentagem
Ecografia	27%
Radiografia	20%
Análises clínicas (hemograma + bioquímica sanguínea)	17%
PAAF	9%
Urianálise	6%
Electrocardiograma	6%
Testes rápidos de diagnóstico	5%
Ecocardiografia	4%
Pressão arterial	2%
Punção de medula óssea	1%
Pesquisa de dermatófitos	0,7%
Eletroretinografia	0,7%
Biopsia de pele	0,6%
Raspagem de pele	0,5%
Mielografia	0,3%
Endoscopia	0,1%
Ressonância magnética	0,1%

1.3. Casuística observada na área da clínica cirúrgica

A área de cirurgia inclui três tipos de intervenções (Tabela 9): pequenas cirurgias, cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica.

Tabela 9: Percentagem relativa dos diferentes tipos de cirurgias observados

Tipos de cirurgias	Percentagem
Pequenas cirurgias	25%
Cirurgia de tecidos moles	65%
Cirurgia ortopédica	10%

Nas pequenas cirurgias (Tabela 10), estão incluídas aquelas em que o animal, salvo raras exceções, não necessita de uma anestesia profunda, sendo às vezes apenas necessário uma anestesia local ou uma ligeira sedação.

Tabela 10: Percentagem relativa das pequenas cirurgias

Pequenas cirurgias	Percentagem
Suturas	28%
Cistocentese	26%
Abdominocentese	14%
Toracocentese	12%
Remoção de cavilhas	6%
Destartarização	6%
Biopsia	4%
Pericardiocentese	4%

A cirurgia de tecidos moles (Tabela 11), tipo de cirurgia seguido com maior frequência durante o período de estágio, pode ser dividida consoante a região em que se intervém, ou o tipo de cirurgia que se realiza.

Nalgumas destas cirurgias recolheram-se amostras de sangue para a realização dos estudos clínicos sobre a proteína C reactiva.

Tabela 11: Percentagem relativa das cirurgias de tecidos moles

Cirurgia de tecidos moles	Percentagem
Tracto reprodutor feminino	30%
Tracto reprodutor masculino	16%
Neoplasias	15%
Tracto gastro-intestinal	12%
Hérnias	8%
Outras cirurgias	7%
Oftalmologia	6%
Tracto urinário	4%
Ouvido	2%

Monografia - Relevância da determinação de proteína C reactiva em cirurgia – estudo preliminar em cão.

1. Resposta de fase aguda

Em situações normais a manutenção da homeostase é garantida por uma série de mecanismos neuroendócrinos, hematopoiéticos e metabólicos. Quando ocorrem alterações que levam a um desvio desta situação, há um comprometimento da saúde do animal, tentando o organismo responder através de modificações metabólicas e sistémicas, ou através de alterações localizadas, como as reacções inflamatórias. O objectivo deste tipo de respostas é tentar restaurar a homeostase e remover a causa da alteração (Moshage, 1997).

A primeira reacção do organismo a uma agressão é uma resposta inata, não específica, que precede as reacções imunológicas específicas. A resposta de fase aguda é uma reacção sistémica do organismo a distúrbios locais ou sistémicos causados por infecção, lesão tissular, trauma ou cirurgia, crescimento de processos neoplásicos ou alterações inflamatórias (Gruys et al., 2005a). No local da lesão tissular e/ou da invasão por microorganismos, a resposta é iniciada no próprio tecido, havendo libertação de citocinas pró-inflamatórias e activação, tanto do sistema vascular, como de diversas células inflamatórias (Yashamita et al., 1994). Estas respostas levam à libertação de mais citocinas e outros mediadores inflamatórios que se difundem para o compartimento extracelular e passam para a circulação sanguínea. As citocinas actuam a nível de diferentes células alvo, conduzindo a uma reacção sistémica que resulta numa activação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal, numa redução da secreção da hormona de crescimento (Gruys et al., 1999 citado por Gruys et al., 2005a) e em inúmeras alterações físicas clinicamente caracterizadas por febre, anorexia, aumento do catabolismo muscular (van Miert, 1995 citado por Gruys et al., 2005a; Yamashita et al., 1994), alterações no metabolismo dos lípidos e alterações hormonais (Moshage, 1997). Além disso, ocorrem alterações que podem ser valorizadas a nível laboratorial, tais como, diminuição de LDL e HDL no plasma sanguíneo, neutrofilia (Moshage, 1997), aumento dos níveis séricos da hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e de glucocorticóides, activação do sistema do complemento e do sistema de coagulação sanguíneo, diminuição dos níveis séricos de zinco, ferro, vitamina A e α -tocoferol e alteração da concentração de diversas proteínas plasmáticas (proteínas de fase aguda), devido, principalmente, a uma alteração no metabolismo hepático (Gruys et al., 2005a).

A resposta de fase aguda visa evitar a progressão da lesão num determinado órgão, controlar o microorganismo invasor, remover moléculas e detritos e activar e reparar os

mecanismos necessários para que ocorra um retorno dos órgãos ao seu funcionamento normal (Baumann e Gauldir, 1994 citado por Hirvonen, 2000).

2. Proteínas de fase aguda

As respostas de fase aguda compreendem variações nas concentrações de diversas proteínas plasmáticas, denominadas proteínas de fase aguda, e num número elevado de alterações comportamentais, fisiológicas, bioquímicas e nutricionais, tais como alterações neuroendócrinas, hematopoiéticas, metabólicas, hepáticas e nos constituintes plasmáticos não proteicos (Gabay e Kushner, 1999).

As proteínas de fase aguda são proteínas sanguíneas cuja quantificação permite avaliar a resposta inata do sistema imunitário a determinada alteração no organismo (Eckersall, 2006b). As condições que mais comumente conduzem a variações elevadas na concentração destas proteínas incluem infecção, trauma, cirurgia, queimaduras, isquemia tissular, neoplasia e condições inflamatórias. O exercício físico, golpes de calor, parto e stress levam a um aumento moderado ou ligeiro da sua concentração sérica (Gabay e Kushner, 1999). Nas situações crónicas também se verifica o seu aumento mas de uma forma mais lenta (Petersen et al., 2004). Esta situação pode dever-se a uma insuficiência na síntese de mediadores ou a uma incapacidade do fígado em responder ao estímulo das citocinas de forma contínua e prolongada (Hanson e Lindquist, 1997 citado por Gillet, 2002). Por vezes, quando o processo inflamatório é mínimo, as concentrações destas proteínas mantêm-se dentro dos valores de referência (Chambers et al., 1991).

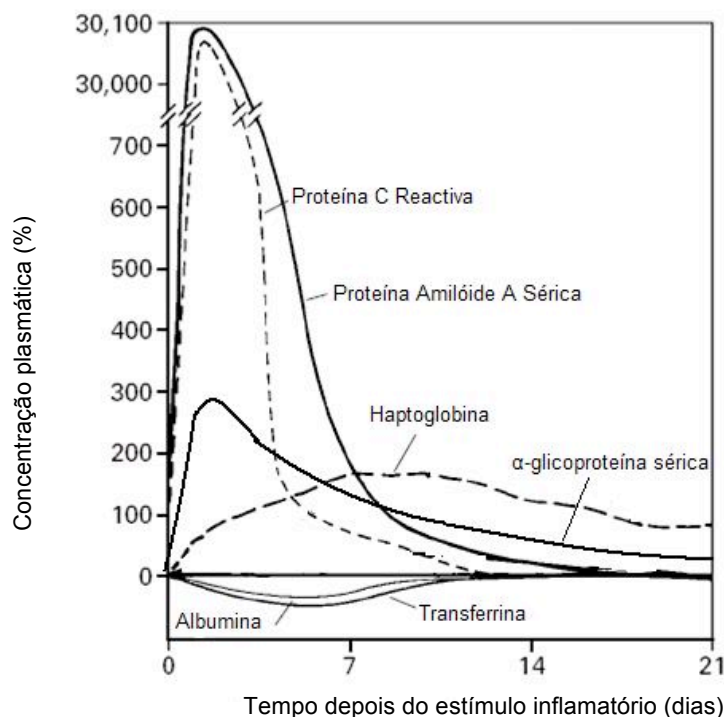
Estas proteínas de fase aguda podem ser definidas de acordo com cinco critérios: (1) uma cinética de evolução rápida, (2) um aumento significativo da concentração plasmática, (3) uma variação independente da etiologia do processo inflamatório, (4) uma variação estrita da reacção inflamatória e (5) a possibilidade de uma dosagem rápida e precisa (Hachulla, 1998 citado por Gillet, 2002).

Podem ser classificadas como proteínas de fase aguda positivas ou negativas, uma vez que a sua concentração aumenta ou diminui pelo menos 25% em relação a valores basais, respectivamente (Eckersall, 2006a).

As proteínas de fase aguda positivas são glicoproteínas sintetizadas principalmente ao nível dos hepatócitos depois da libertação para a corrente sanguínea de citocinas pró-inflamatórias. No cão, estas proteínas podem ser divididas em três grupos (figura 1) de acordo com o aumento da sua concentração aquando da reacção inflamatória. No primeiro grupo, no qual se incluem a proteína C reactiva (PCR) e a proteína amilóide A sérica, a concentração sérica é igual ou menor a 10 µg/ml, podendo aumentar até 100 ou 1000 vezes na presença de um estímulo inflamatório. Estas proteínas atingem um pico cerca das 24-48

horas e retornam rapidamente para os valores normais. A α -glicoproteína sérica, pertencente ao segundo grupo, é uma proteína de fase aguda moderada, e que sofre um aumento de cerca de 5 a 10 vezes após o estímulo, atingindo um pico por volta do 2º-3º dia. O seu retorno a valores normais é mais lento do que nas proteínas pertencentes ao primeiro grupo. Por último, o terceiro grupo, ao qual pertence a haptoglobina, caracteriza-se por apresentar um aumento da concentração de cerca de 2 vezes o valor normal (Eckersall, 2006a).

Figura 1: Características padrão de alterações nas concentrações de algumas proteínas de fase aguda, depois de um estímulo inflamatório (adaptado de Gitlin e Colten citado por Gabay e Kushner, 1999)



Como já foi referido anteriormente, as proteínas de fase aguda negativas são aquelas cuja concentração diminui pelo menos 25% do seu valor basal. Como exemplos deste tipo de proteínas existem a albumina e a transtirretina. Para a síntese de albumina é necessário um elevado número de aminoácidos. Durante uma resposta de fase aguda, as proteínas de fase aguda positivas necessitam destes aminoácidos para a sua síntese, havendo assim uma diminuição da concentração da albumina sérica (Paltrinieri, 2007). Por outro lado, como a transtirretina inibe a produção de interleuquina-1 (IL-1) pelos monócitos e macrófagos, é necessário haver uma diminuição na sua síntese para haver produção das proteínas de fase aguda positivas (Gabay e Kushner, 1999).

3. Proteína C Reactiva

3.1. História de PCR

A proteína C reactiva foi descrita pela primeira vez por Tillet e Francis, em 1930, durante um estudo em pacientes com infecção por *Streptococcus pneumoniae*. O soro obtido a partir destes pacientes, durante a fase aguda dos sintomas, apresentava uma substância que fazia precipitar o polissacarídeo C da parede celular do pneumococo. Nessa altura, foram realizados diversos estudos que verificaram que esta substância não era detectável em pacientes saudáveis, mas que atingia concentrações muito elevadas em pacientes com infecções. Quando havia recuperação, os seus valores eram novamente indetectáveis. Esta substância também foi encontrada no sangue de pacientes com outras doenças febris, tais como infecção por *Streptococcus* hemolíticos, febre reumática e infecção por *Staphylococci* (Marnell et al., 2005).

A noção de proteína C reactiva como proteína de inflamação foi introduzida quando Abernethy e Avery caracterizaram esta substância como sendo de natureza proteica e demonstraram a necessidade da presença do ião cálcio para a sua reacção com o polissacarídeo C (Pepys, 1981 citado por Vergobbi, 1992).

Na década de 70, Volanakis e Kaplan identificaram um ligando específico para a proteína C reactiva, a fosfocolina, que faz parte do ácido teicóico, constituinte da parede celular do pneumococo. Desde então, foram realizados diversos estudos em que se identificaram outros tipos de ligandos (Black, 2005).

3.2. Estrutura e caracterização de PCR

Ao microscópio electrónico, a proteína C reactiva canina apresenta uma configuração cíclica, plana, simétrica e pentamérica (Eckersall e Conner, 1988 citado por Gillet, 2002). É composta por cinco subunidades polipeptídicas, pertencendo, por isso, à família das pentraxinas. As suas subunidades estão unidas por ligações não covalentes, sendo, apenas, duas das cinco, subunidades glicosadas. Por electroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE, -Sodium Dodecyl Sulphate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) podem observar-se duas bandas, que correspondem aos dois tipos de subunidades, glicosadas ou não glicosadas (Caspi et al., 1984).

Cada subunidade apresenta, na face plana, um receptor para a fosfocolina, composto por dois iões de cálcio, que se ligam ao grupo fosfato e um domínio hidrofóbico onde se encontra o grupo metil da fosfocolina. A união da fosfocolina à proteína C reactiva é

mediada pelos resíduos Phe⁶⁶ e Glu⁸¹, em que o primeiro estabelece as interações hidrofóbicas com o grupo metil da fosfocolina e o segundo, que se encontra na face oposta do domínio, interage com o grupo colina carregado positivamente. A face oposta da subunidade, a face efectora, é o local onde se liga a fracção C_{1q} do complemento e onde se pensa que se possa ligar o receptor FcγR. Esta face apresenta uma fissura, que se prolonga do centro da subunidade para o centro da molécula, onde se encontram vários resíduos necessários para ligação de PCR a C_{1q}, como Asp¹¹² e Tyr¹⁷⁵ (Black, 2005).

O peso molecular desta proteína varia consoante o método utilizado para a sua detecção. Este, encontra-se entre os 100 000 Dalton (Eckersall e Conner, 1988 citado por Gillet, 2002) e 155 000 Dalton (Yamamoto et al., 1992 citado por Gillet, 2002) com um valor médio de 115 000 Dalton (Caspi et al., 1984). Utilizando a separação por SDS-PAGE seguida de coloração PAS, demonstrou-se que as suas subunidades glicosadas (coradas) e não glicosadas apresentam um peso molecular de 25 000 e 22 000, respectivamente (Fujise et al., 1992; Onishi et al., 1993 citado por Gillet, 2002).

O ponto isoeléctrico da proteína C reactiva canina está compreendido entre pH=5,3 e pH=6,65 (Caspi et al., 1984).

No Homem, tempo de semi-vida de PCR é cerca de 19 horas (Hanson e Lindquist, 1997 citado por Gillet, 2002), embora alguns autores refiram que seja apenas de 6 a 9 horas (Gewurz et al., 1982 citado por Gillet, 2002)

3.3. Síntese de PCR

O início da resposta de fase aguda ocorre no local da lesão tissular. As células mononucleares locais libertam um largo espectro de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, mediadores lipídicos, aminas vasoactivas, proteases e óxido nítrico e activam as cascatas do complemento e da coagulação (Olson et al., 1995 e Monshouwer et al., 1996 citados por Hirvonen, 2000). Estes mediadores de inflamação iniciam as reacções inflamatórias locais e sistémicas. As primeiras incluem um aumento da permeabilidade capilar e uma infiltração de leucócitos na área de inflamação. Enquanto que o aumento da permeabilidade inflamatória permite o transporte de diferentes moléculas entre a circulação sanguínea e a área da lesão tissular, a migração dos leucócitos até ao local inflamatório é regulada pela sua adesão ao endotélio e, na sequência da activação de mediadores de inflamação (Hirvonen, 2000), o que faz com que as reacções inflamatórias locais influenciem, indirectamente, a reacção sistémica.

As citocinas são polipeptídeos segregados por diversos tipos de células que regulam e determinam a resposta imune, ao promover a sobrevivência, proliferação, diferenciação, activação ou morte das células (Kallio, 2000). Podem ser divididas em três grupos de acordo

com a sua função: citocinas que actuam como factores de crescimento para diversas células (IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 e factor de estimulação de granulócitos-macrófagos), citocinas com propriedades pró-inflamatórias (TNF- α/β , IL-1 α/β , IL-6, IFN- α/γ , IL-8 e proteína-1 inibidora de macrófagos) e factores com actividade anti-inflamatória (antagonistas dos receptores IL-1, receptores solúveis IL-1, proteína de ligação a TNF- α e proteína de ligação a IL-1) (Gruys et al., 2005a).

Os mediadores de inflamação são factores solúveis produzidos ao nível do local de inflamação por células activadas e são responsáveis por efeitos localizados ou sistémicos, iniciando e mantendo a resposta imune. Estes, para além do grupo das citocinas com propriedades pró-inflamatórias, das quais, as que têm maior importância na síntese da proteína C reactiva são IL-6, IL-1 α/β e TNF- α/β , também incluem glucocorticóides e factores de crescimento (factor de crescimento semelhante à insulina, factor de crescimento de hepatócitos, factor de crescimento de fibroblastos, entre outros) (Baumann e Gauldie, 1994, citado por Gillet, 2002). Enquanto que as citocinas estimulam a expressão genómica das proteínas de fase aguda (PFA), os glucocorticóides e os factores de crescimento modulam a actividade das citocinas (Ceciliani et al., 2002). As concentrações plasmáticas destas moléculas são inferiores aos limites de detecção laboratorial, e o seu tempo de semi-vida é de poucos minutos, podendo ser observados, apenas, ligeiros picos sanguíneos. Assim, não é possível utilizar estas moléculas para comprovar a presença de resposta inflamatória (Bienvenu et al., 2000).

Depois de entrarem na circulação sanguínea, estes mediadores de inflamação chegam ao tecido hepático e, através da activação de receptores nos hepatócitos, ocorre a expressão genómica das PFA que inicialmente é regulada a um nível transcricional, levando assim à sua síntese (Ceciliani et al., 2002).

3.3.1. Mediadores de inflamação

Como já foi referido anteriormente, os principais mediadores de inflamação responsáveis pela síntese de PCR são a IL-6, a IL-1, o TNF- α , os glucocorticóides e os factores de crescimento.

A interleuquina 6 é uma fosfoglicoproteína de 184 aminoácidos com um peso molecular de 21 000. Esta citocina é produzida no local da lesão tissular ou do trauma por diversas células, tais como macrófagos, fibroblastos, monócitos, linfócitos B e T, células endoteliais, células epidérmicas, células sinoviais, queranócitos, diversas células tumorais e condrócitos (Yamashita et al., 1994). Seis horas após o estímulo inflamatório, esta interleuquina encontra-se em elevadas concentrações a nível hepático, podendo também encontrar-se no líquido sinovial, líquido cefalo-raquidiano ou na urina, mas em concentrações inferiores

(Nijsten et al., 1987 citado por Gillet, 2002). As suas principais funções são a regulação da resposta imune através da diferenciação de timócitos, linfócitos B e precursores de linfócitos T, estimulação da hematopoiese através da proliferação de precursores dos granulócitos e macrófagos, mielopoiese, eritropoiese, aparecimento dos estados febris, acção endócrina através da síntese de adrenocorticóides e glucocorticóides, síntese hepática das proteínas de fase aguda e inibição da síntese de TNF- α (Yamashita et al., 1994). Num estudo experimental, sintetizou-se uma forma recombinante de IL-6 em *Escherichia coli*. Após a sua purificação, injectou-se por via subcutânea 40 μ g/kg a dez cães de raça Beagle, e pôde-se observar um aumento muito rápido da concentração da proteína C reactiva. Seguidamente, administrou-se um anticorpo específico para a proteína “gp 130”, tendo-se verificado a inibição da actividade da IL-6, uma vez que esta proteína é uma subunidade desta interleuquina (Weinhold e Ruther, 1997). Verificou-se que depois desta administração, os valores de PCR baixaram significativamente (Nijsten et al., 1987 citado por Gillet, 2002), podendo concluir-se que a IL-6 activa a síntese desta proteína. Existe um atraso entre o pico de IL-6 e o pico de proteína C reactiva, devido ao tempo necessário para a estimulação hepática, e posterior síntese desta proteína. Quando o nível dos mediadores de inflamação, que se encontram em circulação, diminui, não há estimulação do fígado, não ocorrendo assim, a síntese da proteína C reactiva. Verifica-se, então, que a resposta do fígado depende da quantidade de IL-6 presente no sangue (Liu et al., 2000).

A interleuquina 1 é uma proteína de 152 aminoácidos com um peso molecular de 17 000 e que apresenta dois polipeptídeos (IL-1 α e IL-1 β) com propriedades semelhantes. Esta molécula é sintetizada por monócitos, macrófagos, neutrófilos polinucleares, linfócitos B e T, células endoteliais, fibroblastos, queranócitos, adipócitos e células dendríticas. As suas funções são principalmente: acção celular (activação de neutrófilos, activação de osteoclastos e destruição da matriz óssea, produção de prostaglandinas e collagenases pelas células sinoviais) (Collet, 1995 citado por Gillet, 2002), acção endócrina (síntese de prostaglandinas e de leucotrienos envolvidos no mecanismo da febre e de vários sintomas de choque séptico (Bienvenu et al., 2000) e secreção de IL-2 responsável pela activação de linfócitos T) e acção sinérgica com a IL-6 na síntese de proteína C reactiva pelo fígado, amplificando a sua actividade (Hachulla, 1998 citado por Gillet, 2002; Yamashita et al., 1994).

O TNF- α é um polipéptido não glicosado composto por 157 aminoácidos (Collet, 1995 citado por Gillet, 2002). Esta citoquina é secretada por monócitos e macrófagos, principalmente, por estimulação por endotoxinas bacterianas (Gruys et al., 1994 citado por Gillet, 2002). As suas principais funções são o efeito citotóxico e citostático, inibição da lipoproteína lipase, que leva a uma diminuição da captação e armazenamento de triglicéridos exógenos pelos adipócitos, activação de osteoclastos e destruição da matriz óssea, desenvolvimento de caquexia nos casos de infecções crónicas e neoplasias, aparecimento de sintomas ligados

ao choque séptico, ao induzir alterações metabólicas, hemodinâmicas e tissulares, activação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos polinucleados, acelerando a sua degradação e capacidade de adesão às células endoteliais, e síntese das proteínas de fase aguda em associação com IL-6 e IL-1 (Yamashita et al., 1994; Collet, 1995 citado por Gillet, 2002).

Os glucocorticóides e os factores de crescimento podem actuar directamente na produção de proteínas de fase aguda, ou actuar em sinergia com a IL-1 e a IL-6 (Ritchie e Navolotskaia, 1996 citado por Gillet, 2002). Actuam através da inibição da expressão dos genes que codificam as citocinas, reduzindo, assim, a sua libertação pelos macrófagos e monócitos. Isto leva a que haja um limite da toxicidade das interleuquinas e do TNF- α , diminuindo a síntese das proteínas de fase aguda. As citocinas, ao estimularem a síntese de adrenocorticóides, desencadeiam um mecanismo de retro-alimentação negativa (“feed-back” negativo) pelo cortisol endógeno (Baumann e Gauldie, 1994 citado por Gillet, 2002). Assim, os glucocorticóides e os factores de crescimento regulam a produção de PCR ao modular a libertação de citocinas e a resposta do fígado.

3.3.2. Síntese hepática de PCR

Após a indução da sua síntese e libertação, os mediadores de inflamação entram em circulação e atingem o fígado, onde se ligam a receptores membranários. A síntese de PCR inicia-se nos hepatócitos periportais e prossegue, de forma centrípeta, pelos lóbulos hepáticos (Kushner e Feldmann, 1978). Há um aumento significativo da concentração de PCR sérica quatro a doze horas após o estímulo (Caspi et al., 1984), que duplica em oito a dez horas (Osmand et al., 1977). A sua concentração atinge um pico às 24-48 horas (Eckersall, 2006c).

Para que haja síntese das proteínas de fase aguda é necessária uma activação das RNA polimerases, que levam a um aumento da síntese do RNA mensageiro. Por sua vez, uma hipertrofia do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi conduz a uma activação das glico-transferases e a uma glicosilação da fracção proteica, que termina numa secreção plasmática de PCR (Vergobbi, 1992).

No Homem, o gene codificante para a proteína C reactiva, localizado no braço curto do cromossoma 1, contém apenas um intrão, que separa a região que codifica o sinal peptídico da que codifica a proteína madura. Como já foi referido, a indução de PCR nos hepatócitos é regulada, a um nível transcricional, principalmente, pela IL-6, cujo efeito pode ser aumentado pela IL-1. Ambas as citocinas controlam a expressão de vários genes das proteínas de fase aguda através da activação dos factores de transcrição STAT3, membros da família da C/EBP e proteínas rel (NF- κ B). A regulação de cada gene codificante das proteínas de fase aguda é devido a interacções induzidas pelas citocinas e pelos factores

de transcrição, nos seus promotores. Para a PCR, os factores C/EBP β e C/EBP δ , são essenciais para esta indução. Para além dos locais de ligação para o C/EBP, a região proximal da subunidade do gene codificante de PCR contém locais de ligação para STAT3 e proteínas rel. As interacções entre estes factores vão resultar numa máxima indução da expressão do gene (Black, 2005).

Quando há uma diminuição da resposta inflamatória, a síntese da proteína C reactiva é também diminuída, principalmente por dois mecanismos. Por um lado, o curto tempo de semi-vida dos mediadores de inflamação leva a que a ausência de estimulação por parte do fenómeno inflamatório diminua a libertação de citocinas, e, assim, a de proteína C reactiva. Por outro lado, há um mecanismo de retro-alimentação negativa na síntese de PCR, através da libertação de uma protease pelos neutrófilos que vai promover a degradação desta proteína (Steel e Whitehead, 1994 citado por Gillet, 2002).

Embora a síntese de PCR seja feita principalmente a nível hepático, também está descrita a sua síntese a nível dos neurónios, monócitos, linfócitos (Murphy et al., 1991), pulmão, adipócitos e intestino (Eckersall, 2006b). Os mecanismos que regulam esta síntese não estão descritos, mas pensa-se que não influenciam substancialmente os níveis séricos de PCR (Black, 2005).

3.4. Proteína C reactiva em diferentes espécies animais

Embora a resposta de fase aguda siga um padrão semelhante nas diferentes espécies animais, existem numerosas diferenças nas suas características. Não obstante, as diferentes proteínas de fase aguda se encontrarem na corrente sanguínea de quase todos os animais, os seus padrões de resposta podem variar grandemente (Hirvonen, 2000).

Apesar de ser no cão e no Homem que a PCR tem maior significado como proteína de fase aguda, esta também pode ser encontrada na corrente sanguínea de diversos mamíferos, aves e alguns peixes.

A tabela 12 apresenta as principais características da proteína C reactiva em diferentes espécies animais.

Ao contrário dos canídeos, a proteína C reactiva não é o marcador ideal de inflamação nos felinos e nos bovinos. Devem-se, assim, utilizar outras proteínas de fase aguda, como por exemplo a α -glicoproteína sérica e a proteína amilóide A sérica, respectivamente (Eckersall, 2006a; Hirvonen, 2000).

Tabela 12: Características e valores da proteína C Reactiva em diferentes espécies animais (adaptado de Gillet, 2002)

Espécie animal	Concentrações sanguíneas	Particularidades
Felinos (Gruys et al., 1994, Kajikawa et al., 1999 citado por Gillet, 2002)	Valores normais: $160,1 \pm 27,5$ µg/ml em 20 gatos saudáveis, 1-3 anos, pelo método da imunodifusão Inflamação: $269,6 \pm 81,6$ µg/ml depois de uma injeção com LPS	Não existe um aumento significativo na presença de uma alteração inflamatória; o stress pode provocar alterações da concentração
Bovinos (Eckersall e Conner, 1988, Morimatsu et al., 1989 e Gruys et al., 1994 citado por Gillet, 2002;)	Valores basais: 10-30 µg/ml	Não tem significado como proteína de fase aguda
Coelho (Tanaka e Robey, 1983 citado por Gillet, 2002, Osmand et al., 1977)	Valores basais: $9,1 \pm 4,7$ µg/ml, em animais saudáveis, pelo método ELISA Inflamação: $118,8 \pm 58,5$ µg/ml, após injeção de óleo de terebentina	Sequência de aminoácidos semelhante à proteína C reactiva humana
Rato (Pepys e Baltz, 1983 citado por Gillet, 2002; De Beer et al., 1982)	Valores basais: 300-600 µg/ml, em animais saudáveis, 3 semanas a adultos, electro-imunoteste Inflamação: até 900 µg/ml após injeção de óleo de euforbiácea	Sequência de aminoácidos semelhante à proteína C reactiva humana;
Homem (Steel e Whitehead citado por Gillet, 2002)	Valores basais: 0,07-8 µg/ml Inflamação: 40 µg/ml	Cinco unidades não glicosadas

LPS – lipopolissacarídeo bacteriano

3.5. Antigenicidade de PCR

Em 1993, Yamamoto et al. realizaram um estudo de forma a verificar se havia reacções cruzadas entre a proteína C reactiva canina e humana. Foram recolhidos soros de cinco cães que apresentavam um processo inflamatório. Estes foram inoculados em quatro cabras e trinta coelhos, de forma a produzir anti-soros. Por imuno-electroforese, verificou-se que os trinta e quatro anti-soros reagiram com a PCR canina, mas não reagiram com a molécula humana, excepto quando as concentrações de PCR foram elevadas, uma vez que existem alguns epitopos comuns às duas moléculas. Demonstrou-se que, se a concentração de PCR for menor do que 150 µg/ml, não há qualquer tipo de reacção cruzada. Esta, apenas ocorre entre anticorpos anti-proteína C reactiva humana e a proteína C reactiva canina, quando as concentrações de antígenos e anticorpos são muito elevadas (Yamamoto et al., 1993a)

Embora possa ocorrer, em casos de elevados títulos, uma reacção entre a proteína C reactiva canina e anticorpos anti-proteína C reactivos humana, os testes comerciais humanos não devem ser utilizados para amostras caninas (Yamamoto et al. 1993a; Fujise, 1994). Devem-se utilizar anticorpos específicos de forma a obter dados fidedignos (Maudsley e Pepys, 1987).

3.6. Função de PCR

A inflamação é um processo complexo e organizado que envolve vários tipos de células e moléculas. Estas podem iniciar, amplificar ou manter o processo inflamatório, podendo ainda atenuá-lo ou resolvê-lo. Algumas das moléculas envolvidas são multifuncionais e contribuem para o aumento ou diminuição do processo inflamatório em diferentes pontos da sua evolução. Muitas das proteínas de fase aguda, incluindo a proteína C reactiva, têm a capacidade de influenciar uma ou várias etapas deste processo (Gabay e Kushner, 1999).

A estrutura pentamérica cíclica de PCR permite a sua ligação a diversas bactérias patogénicas ou antígenos intracelulares de células danificadas, reconhecendo, moléculas estranhas ao organismo. Esta tem, assim, um papel importante na protecção contra processos infecciosos, eliminação de tecidos alterados, prevenção de reacções de auto-imunidade e regulação da resposta inflamatória (Mold et al., 2002). Tem, também, a capacidade de activar o sistema do complemento pela via clássica, interagir com receptores específicos em células fagocíticas e induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias (Du Clos and Mold, 2001 citado por Murata et al., 2004), estimular a fagocitose e ligar-se a receptores de imunoglobulinas IgG (FcγR) (Black, 2005).

3.6.1. Fixação a ligandos

A PCR tem a capacidade de se ligar a um elevado número de ligandos como a fosfocolina, a lecitina, a liolecitina, a esfingomiélin, certos poli-aníons como o ácido desoxirribonucleico, moléculas catiónicas (protamina, histona e heparina), lípidos (lipossomas, lipoproteínas, apolipoproteínas como a LDL responsável pelo transporte de colesterol), entre outros (Gillet, 2002), com os quais vai interagir e eliminar através da activação do complemento.

O ligando melhor caracterizado é a fosfocolina. Este encontra-se presente num elevado número de bactérias e é um constituinte da esfingomiélin e da fosfatidilcolina das células eucarióticas (Black, 2005). Embora o reconhecimento da fosfocolina ou de outras moléculas presentes nos microorganismos pela proteína C reactiva tenha um papel na defesa do organismo, este ocorre apenas na ligação a células com membranas lesadas, uma vez que

a fosfolipase, normalmente, não se encontra à superfície das células, sendo exposta apenas quando ocorre desintegração da membrana celular (Black, 2005).

A ligação de PCR a um ligando activa a via clássica do complemento através da interacção com C_{1q} (Black, 2005), desempenhando, assim, um papel importante na defesa do organismo.

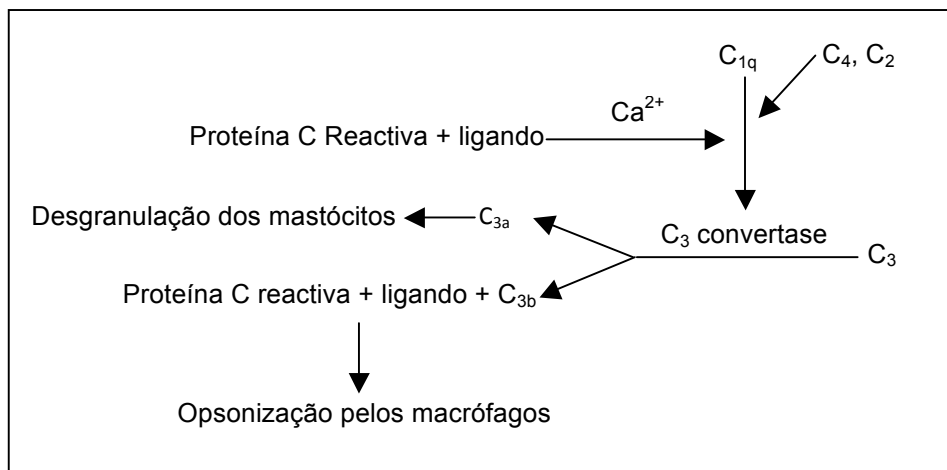
3.6.2. Activação da via clássica do sistema do complemento

O sistema do complemento, constituído por cerca de trinta proteínas, tem um papel importante na defesa do organismo contra agentes infecciosos e na resposta inflamatória. Existem três vias pelas quais o complemento pode ser activado: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas, sendo a primeira a utilizada pela PCR. Os componentes mais importantes da via clássica são C_1 - C_9 , e esta desencadeia-se pela ligação de complexos antígeno-anticorpo a C_{1q} . A fase inicial da activação leva à clivagem dos produtos C_3 e C_4 , que, por sua vez, actuam como opsoninas. A última fase desta via envolve o complexo de ataque membranário C_5 - C_9 , que têm uma elevada acção inflamatória, gerando péptidos quimiotácticos. Estes levam à lise das bactérias ou das células à qual se ligam (Black, 2005).

A PCR, ao interagir com os ligandos, tem a capacidade de fixar a fracção C_{1q} do complemento que, por sua vez, activa a C_3 convertase. Esta última, transforma a fracção C_3 do complemento em C_{3a} , que participa na desgranulação dos mastócitos, e em C_{3b} . O complexo C_{3b} – ligando – PCR, formado na superfície da célula-alvo, é reconhecido pelos macrófagos ao nível do receptor membranário do C_{3b} , sendo este fagocitado e opsonizado (figura 2) (Vergobbi, 1992).

A activação do complemento pela proteína C reactiva limita-se à fase inicial da via clássica, envolvendo apenas C_1 - C_4 , com pouca activação das últimas proteínas C_5 - C_9 . Isto ocorre devido à capacidade da proteína C reactiva de interagir com o factor H e com a proteína de ligação a C_{4b} (Sjoberg et al., 2006), levando à inibição das vias que resultam na formação das C_5 convertases. Assim, as respostas inflamatórias associadas a C_{5a} e C_5 - C_9 são limitadas, o que leva a que a proteína C reactiva participe no sistema de defesa do organismo limitando os efeitos inflamatórios das últimas etapas do sistema do complemento (Black, 2005).

Figura 2: Activação do sistema do complemento pela via clássica pela proteína C reactiva (adaptado de Vergobbi, 1999)



3.6.3. Fagocitose

Embora, como foi explicado anteriormente, a activação do complemento conduza a um aumento da fagocitose, a ligação de PCR a células fagocitárias também é mediada pelos receptores Fc-gamma (Bharadwaj et al., 1999). Os receptores Fc encontram-se na superfície de determinadas células como macrófagos, neutrófilos e mastócitos, contribuindo para a eficácia da protecção pelo sistema imunitário. Existem três classes de receptores Fc-gamma – FcγRI, FcγRII e FcγRIII – tendo a PCR uma baixa afinidade pela FcγRI e uma elevada afinidade pela FcγRII (Stein et al., 2000). Os receptores Fc-gamma apresentam domínios estimulatórios, caracterizados por uma sequência citoplasmática ITAM (immunoreceptor tyrosine-based cativation motif) e um domínio inibitório, caracterizado pela presença de uma sequência ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). As respostas biológicas mediadas pelo primeiro incluem fagocitose e secreção de citocinas, que na presença dos receptores inibitórios irão ser anuladas (Black, 2005).

3.6.4. Eliminação de detritos celulares

Em 1982, Gewurz observou que no Homem, após um enfarte cardíaco, era possível detectar, por imunofluorescência depósitos de proteína C reactiva nas fibras musculares necrosadas do órgão afectado e que as fibras saudáveis não apresentavam qualquer tipo de alteração na coloração, concluindo que a PCR participa no catabolismo e eliminação de detritos celulares ao nível do foco inflamatório (Gewurz et al., 1982 citado por Gillet, 2002). Quando ocorrem modificações tissulares, as células sofrem alterações que levam à libertação de certas moléculas, como a cromatina (Vergobbi, 1992), a laminina e a fibronectina (Ritchie et al., 1996 citado por Gillet, 2002). Estas, vão formar complexos com a

proteína C reactiva, que serão destruídos por acção do complemento e de nucleases (Du Clos et al., 1988).

3.6.5. Protecção contra infecções

Através da inoculação em animais de laboratório ou transgénicos, foi demonstrado que a proteína C reactiva tem um papel de protecção contra infecções bacterianas. Num grupo de ratos transgénicos infectados com *Streptococcus pneumoniae* administrou-se proteína C reactiva humana, havendo um grupo controlo que não sofreu qualquer tipo de inoculação. Passadas 24 horas, observou-se que a bacteriémia era significativamente mais baixa nos animais aos quais foi administrada a proteína C reactiva, levando a que estes animais tivessem um tempo de vida maior ou uma taxa de mortalidade menor (Suresh et al., 2007). Verificou-se, assim, que a proteína C reactiva contraria a multiplicação bacteriana nas primeiras fases da infecção ao activar o complemento, o que leva a que a sua patogenicidade e toxicidade sejam limitadas.

3.6.6. Protecção dos vasos

A proteína C reactiva tem um papel protector dos vasos, uma vez que inibe a agregação plaquetária através da sua ligação ao factor de activação plaquetária (PAF) e à membrana fosfolipídica das plaquetas. Esta última ligação vai proteger as membranas dos efeitos dos lisólípidos e das fosfolipases, uma vez que evita o efeito detergente e consequente ruptura das membranas celulares pelos primeiros e conduz à inibição da libertação do ácido araquidónico, bloqueando assim a produção de mediadores de inflamação, no caso das fosfolipases. O facto de PCR se ligar ao PAF vai diminuir a permeabilidade vascular, uma vez que este vai activar as plaquetas e aumentar a ligação dos leucócitos às células endoteliais (Vigo, 1985).

3.6.7. Acção anti-neoplásica

A influência da proteína C reactiva no desenvolvimento de metástases pulmonares na presença de fibrossarcoma foi estudada num modelo em que se induziu a formação deste tipo de tumor nas patas de 250 ratinhos de laboratório (Deodhar et al., 1982) Observou-se que a PCR induzia a lise de células tumorais pelo sistema imunitário. Dezassete dias após a inoculação, e após a amputação da pata, foi administrado por via endovenosa um composto de lipossoma com proteína C reactiva humana a um grupo de animais. Aos grupos controlo

não foi administrado qualquer tipo de tratamento ou administraram-se compostos de lipossoma com IgG humana, LPS ou albumina sérica. No trigésimo quinto dia, depois de eutanasiados, verificou-se que os animais tratados com o composto lipossoma-PCR humano, apresentavam metástases mais pequenas e em menor número em comparação com os grupos controlo. 38% não apresentaram qualquer tipo de metástase pulmonares e a taxa de sobrevivência foi significativamente maior neste grupo (Deodhar et al., 1982).

3.7. Detecção de PCR

A monitorização da concentração sérica da proteína C reactiva permite obter informações sobre a resposta imunitária inata do organismo. Em Medicina Veterinária a detecção desta baseia-se na utilização de testes imunológicos, onde os mais utilizados são: electro-imuno-ensaio, imunodifusão, ELISA, imunoturbidimetria, “capillary reversed passive latex agglutination” (CRPLA) e a imunocromatografia (Hayashi et al., 2001; Parra et al., 2006a). Como já foi referido anteriormente, os reagentes utilizados têm de ser específicos para a proteína C reactiva canina.

A PCR canina pode ser detectada a partir de várias amostras, sendo a mais frequente o sangue venoso. Em Medicina Humana existem diversos estudos nos quais se utiliza líquido ascítico (Claus et al., 1976 citado por Gillet, 2002), líquido pleural (Gewurz et al., 1982 citado por Gillet, 2002), líquido cefalo-raquidiano (Van Lente, 1982 citado por Gillet, 2002), entre outros. Embora em menor número, em medicina veterinária, também existem estudos que utilizam outros líquidos biológicos como líquido bronco-alveolar (Casals et al., 1998), saliva (Parra et al., 2005), líquido sinovial (Hurter et al., 2005) e diferentes tipos de efusões (Parra et al., 2006b)

O sangue obtido, de forma asséptica, a partir de uma veia periférica, deve ser colocado num tubo seco. Após centrifugação, recolhe-se o soro, e a amostra deve ser refrigerada por um período máximo de 24 horas entre 2°C e 8°C. Se a análise não for efectuada durante este período, pode-se conservar o soro a uma temperatura inferior a -10°C (Caspi et al., 1984), durante um tempo superior a três meses (Riley e Zontine, 1972 citado por Kjelgaard-Hansen, et al., 2003).

Para que não haja alterações nos valores de PCR, devem-se evitar amostras de sangue hemolisadas, lipémicas ou bilirrubinémicas. A hemólise leva a aumentos da concentração desta proteína e tanto a bilirrubina como a presença de triglicéridos levam a uma diminuição. Os anticoagulantes também podem alterar os valores, como por exemplo o citrato, que leva a uma diminuição significativa das concentrações de proteína C reactiva (Martínez-Subiela e Céron, 2005a). Para evitar estas alterações, como já foi referido, o sangue deve ser recolhido para um tubo seco, e devem-se realizar análises hematológicas e bioquímicas

concomitantes, de forma a interpretar os valores de PCR, consoante as alterações que o animal possa apresentar.

3.7.1. Imunodifusão

A imunodifusão é uma técnica na qual ocorre uma reacção de precipitação do complexo antigénio-anticorpo, num gel de agarose, sendo o método de imunodifusão radial o mais utilizado na detecção da proteína C reactiva. Anticorpos monoespecíficos são incorporados no agar, sendo este colocado em placas até solidificar. São escavados pocilhos no agar, onde se colocam os antigénios em estudo. Estes começam a difundir-se de forma centrífuga, formando com os anticorpos complexos insolúveis. O diâmetro do halo de precipitação obtido em torno do pocilho é directamente proporcional ao teor de antigénio colocado; quanto maior o diâmetro, maior a sua concentração (Prescott et al., 1999).

3.7.2. Electro-imuno-ensaio

O princípio base do electro-imuno-ensaio é muito semelhante à imunodifusão, sendo a migração dos antigénios acelerada por um campo eléctrico. O precipitado formado apresenta a forma de uma espécie de “foguetes”, em que a altura é proporcional ao logaritmo da concentração (Dore, 1994 citado por Gillet, 2002).

3.7.3. ELISA

Para a detecção da proteína C reactiva utiliza-se o método *sandwich*, sendo a microplaca revestida por ligandos para a proteína C reactiva: anticorpos específicos (Yamamoto et al., 1992 citado por Gillet, 2002) ou fosfocolina (Eckersall et al., 1988 citado por Gillet, 2002). Após o revestimento da placa, adiciona-se o antigénio e procede-se à lavagem. Neste passo, os antigénios livres são eliminados, permanecendo na placa os complexos antigénio-ligando. Posteriormente, adiciona-se um complexo enzima-anticorpo que se vai unir ao primeiro complexo; seguidamente, adiciona-se um substrato, cromogénico que vai sofrer alterações na sua coloração por acção da enzima (Prescott et al., 1999). A quantificação da proteína C reactiva é feita por leitura da densidade óptica, num espectrofotómetro, a 414 nm (Gillet, 2002).

3.7.4. Imunoturbidimetria

A imunoturbidimetria é uma técnica que se baseia na junção do soro com anticorpos específicos para PCR, que vão com esta formar complexos imunes. A formação destes complexos é avaliada num espectrofotómetro a 340 nm, a cada 25 segundos, durante quatro minutos e meio. A turvação produzida é proporcional à concentração da proteína C reactiva presente no soro, obtendo-se, assim, uma curva padrão com as concentrações em mg/L (Rogowski et al., 2005).

3.7.5. CRPLA

Este método utiliza umas microesferas de látex com diâmetro de 0,12 µm que são revestidas por imunoglobulinas G de coelho anti-proteína C reactiva canina. Após adição do soro, são colocadas num tubo capilar que é submetido a centrifugação. A altura da coluna de látex precipitado, medida dentro do tubo capilar, permite realizar uma curva de calibração e assim determinar a concentração da proteína C reactiva (Tagata et al., 1996 citado por Gillet, 2002).

3.7.6. Imunocromatografia

A imunocromatografia é um teste qualitativo rápido que utiliza anticorpos anti-proteína C reactiva canina. A técnica consiste na mistura de uma gota de soro com 1 ml de solução tampão. Posteriormente, coloca-se na zona apropriada do teste rápido, uma gota dessa mistura com três gotas da solução tampão, esperando-se 5 minutos até obter o resultado. A presença de uma banda azul igual à da banda controlo é indicativa de um resultado positivo, o que corresponde a uma concentração da proteína superior a 5 µg/ml. Quando a intensidade da banda azul é menor que a da banda controlo, estamos na presença de um teste fracamente positivo, equivalendo a uma concentração entre 3 e 5 µg/ml. Por último, um teste negativo corresponde a uma concentração de proteína C reactiva inferior a 3 µg/ml (McGrotty et al., 2004).

3.8. Comparação com outros marcadores de inflamação

Para o diagnóstico de um processo inflamatório existem diversos parâmetros que podem ser utilizados em clínica. Por vezes, estes parâmetros são um pouco subjectivos, uma vez que podem apresentar tempos de semi-vida prolongados, uma resposta demorada ou podem

sofrer alterações devido à interferência de outros parâmetros. Devido à sua cinética rápida, à sua fácil interpretação, boa sensibilidade e ao elevado intervalo de valores, a PCR pode ser utilizada para diagnóstico, por si só ou em associação com outros parâmetros.

Na fase aguda de uma doença ainda é controverso se a PCR é um marcador mais fiável do que a contagem de neutrófilos para avaliar a gravidade da infecção (Hurter et al., 2005). No entanto, tem sido aceite que pacientes com evidência clínica de inflamação, mas com resposta da medula óssea insuficiente ou anormal, um aumento de PCR pode ter valor de diagnóstico (Burton et al., 1994 citado por Hurter et al., 2005). Certas alterações patológicas ou tratamentos como a leucemia e a quimioterapia, podem induzir uma neutropénia, que fragiliza os animais devido a uma maior sensibilidade a infecções. A utilização de PCR nestes casos pode ser mais útil do que a contagem de leucócitos, uma vez que os seus valores estão alterados (Starke et al., 1984 citado por Gillet, 2002) e apresentam uma cinética mais lenta do que a PCR (Sabel e Wadsworth, 1979 citado por Gillet, 2002).

Fransson et al. (2006) demonstraram que a PCR, juntamente com a temperatura corporal e a frequência cardíaca são os parâmetros mais fiáveis no diagnóstico de síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS), em relação a outros, como TNF- α , IL-6, albumina, fosfatase alcalina, neutrófilos, plaquetas, glóbulos brancos e frequência respiratória (Fransson et al., 2006).

3.9. Variações biológicas de PCR

3.9.1 Valores normais

As concentrações basais da proteína C reactiva variam em função do método utilizado para a sua detecção e dos animais testados. De acordo com a literatura (Yamamoto et al., 1993b, Burton et al., 1994, Ndung'u et al., 1991 citado por Gillet, 2002, Otabe et al., 1998, Caspi et al., 1984), foram realizados diversos estudos em animais saudáveis. Os diferentes métodos utilizaram anticorpos específicos para a proteína C reactiva canina.

De uma forma geral os valores de PCR obtidos em animais, sem qualquer patologia, foram inferiores a 6 $\mu\text{g/ml}$ (Otabe et al., 1998; Kjelgaard-Hansen et al., 2003), embora estes possam variar entre 0,8 e 30 $\mu\text{g/ml}$ (Hurter et al., 2005). De entre os valores obtidos, o mais elevado foi de 30,04 $\mu\text{g/ml}$ (Yamamoto et al., 1993b), não querendo este indicar que existisse qualquer tipo de alteração (Gillet, 2002).

Para a avaliação de PCR deve assim ter-se os valores de referência para o tipo de teste utilizado e também os valores estipulados por cada método ou laboratório.

3.9.2. Variações fisiológicas

Estão descritas variações fisiológicas nos teores séricos de PCR, embora os estudos publicados não sejam facilmente comparáveis devido às diferentes metodologias seguidas, técnicas utilizadas e também devido ao próprio desenho experimental, nomeadamente o tamanho da amostra e variação dentro de cada grupo considerado.

3.9.2.1. Idade

Para determinar se a idade influencia a concentração da proteína C reactiva foram realizados dois estudos em cães. No primeiro, foram utilizados 66 animais saudáveis, de raças variadas e com idade inferior a 13 anos. Foram formados quatro grupos, sendo o primeiro constituído por 18 animais com menos de 2 anos, o segundo por 27 animais com idades entre 2 e 5 anos, o terceiro por 14 animais com idades entre 6 e 9 anos e o último por 7 animais com idades entre 10 e 13 anos. Em todos os grupos não se verificaram quaisquer alterações nas concentrações da proteína C reactiva, mantendo-se, esta, dentro dos valores normais (Yamamoto et al., 1994 citado por Gillet, 2002).

Hayashi et al. (2001) publicaram outro estudo onde foram utilizados três grupos de cães da raça Beagle com diferentes idades. Cada grupo era composto por dois machos e duas fêmeas, tendo o primeiro um mês, o segundo três meses e o terceiro dezoito meses. Quarenta e oito horas após a administração de óleo de terebentina, com o objectivo de induzir um processo inflamatório, foram medidas as concentrações de PCR pelo método ELISA. Os resultados demonstraram que não havia qualquer variação no segundo e terceiro grupos, mas que os animais que apresentavam apenas um mês de idade tiveram concentrações significativamente menores (Hayashi et al., 2001).

Conclui-se, assim, que na presença de um processo inflamatório, os métodos utilizados para a quantificação da proteína C reactiva em cachorros com idade inferior a 3 meses devem ter uma sensibilidade elevada de forma a poderem detectar concentrações baixas e que os valores obtidos são inferiores aos valores normais.

3.9.2.2. Género

Foram realizados quatro estudos de forma a verificar se a concentração da proteína C reactiva variava entre machos e fêmeas, apresentando-se os valores médios na tabela 13.

Tabela 13: Valores da proteína C reactiva em 304 cães saudáveis, de diferentes raças, em função do género (adaptado de Gillet, 2002)

Animais	Género	Média (µg/ml)	Referência
66 cães saudáveis, de diferentes raças e idade inferior a 13 anos	31 Machos	8,7	Yamamoto et al., 1994 citado por Gillet, 2002
	35 Fêmeas	8,2	
84 cães saudáveis, Beagle, com 6 meses	41 Machos	6,8	
	43 Fêmeas	5,6	
10 cães de raça Beagle, saudáveis, com idades entre 1 e 2 anos	5 Machos	5,05	Otabe et al., 1998
	5 Fêmeas	5,08	
144 cães saudáveis, da raça Beagle, com idades entre 3 meses e 6 anos	70 Machos	7,9	Kuribayashi et al., 2003
	74 Fêmeas	8,3	

Como se pode verificar, não existe qualquer diferença significativa entre machos e fêmeas nos valores de proteína C reactiva.

3.9.2.3. Ritmo circadiano

Otabe et al. (1998) publicaram um estudo cujo objectivo era avaliar se as concentrações de PCR variavam ao longo de 24 horas ou de quatro semanas.

Foram recolhidas 7 amostras de sangue de dez cães da raça Beagle, com um intervalo de aproximadamente 3 horas, durante 24 horas e duas amostras por dia, três vezes por semana, durante quatro semanas. Os resultados obtidos foram constantes ao longo das 24 horas e das quatro semanas, indicando que a concentração desta proteína não varia ao longo do dia nem do mês (Otabe et al., 1998).

3.9.2.4. Gestação

Um aumento da concentração da proteína C reactiva sérica é frequentemente observado em cadelas gestantes, do 30  ao 45  dia, após a ovulação (Kuribayashi et al., 2003), o que coincide com a implantação do embrião no endométrio uterino, provavelmente devido a

presença de uma inflamação local. Uma vez que este aumento não se verifica em todas as cadelas e por ser limitado no tempo, esta proteína não deve ser utilizada para o diagnóstico de gestação, devendo, para isso, usar-se o raio X ou a ecografia, sendo este último o método de eleição (Fransson et al., 2004). Para além disso, deve ter-se em conta que a PCR é um marcador inespecífico de inflamação, podendo levar a um erro de diagnóstico, por haver processos inflamatórios concomitantes com a suspeita de gestação.

3.9.2.5. Tipo de vida

O stress e o tipo de vida dos animais de companhia são duas características que podem influenciar os parâmetros sanguíneos utilizados no diagnóstico. Entre estes, os mais frequentes são a contagem de leucócitos e a glicémia. De forma a verificar se a proteína C reactiva pode ser influenciada por estes parâmetros realizaram-se dois estudos.

Foram formados três grupos: o primeiro com 66 cães, de raças variadas, pertencentes a particulares, o segundo por 84 Beagle que viviam em jaulas (Yamamoto et al., 1994 citado por Gillet, 2002) e o último por 20 Beagle que viviam num ambiente controlado (Yamamoto et al., 1992 citado por Gillet, 2002), de forma a limitar ao máximo a estimulação do sistema imunitário. Os parâmetros controlados neste ambiente foram a humidade, temperatura e alimentação.

Os resultados permitiram observar que não houve diferença significativa entre os cães pertencentes a particulares e os mantidos em jaulas, mas os animais mantidos em ambiente controlado apresentaram concentrações significativamente inferiores. Isto indica que os animais, cujo sistema imunitário é estimulado, apresentam valores de proteína C reactiva fisiológicos superiores, devendo estes ser tomados como valores de referência (Gillet, 2002).

3.9.2.6. Influência dos medicamentos

A influência da utilização de medicamentos sobre a concentração sanguínea da proteína C reactiva ou a sua síntese ao nível do fígado permanece controversa. Alguns autores defendem que os corticosteróides administrados actuam como os seus análogos endógenos, diminuindo a libertação de citocinas pelos macrófagos e, por conseguinte, a síntese desta proteína pelo fígado (Hachulla, 1998 citado por Gillet, 2002). Outros, pelo contrário, sugerem que as doses anti-inflamatórias ou imunossupressivas não têm qualquer efeito na síntese da proteína C reactiva (Martínez-Subiela et al., 2004).

Em medicina humana, existe um estudo realizado por Hansson e Lindquist (1997), que refere que os antibióticos podem alterar as concentrações de proteína C reactiva, não existindo até ao momento qualquer estudo em medicina veterinária (Gillet, 2002).

De qualquer forma, quando se quantifica a proteína C reactiva deve ter-se em conta os medicamentos que estão a ser administrados ao animal para uma adequada interpretação dos resultados.

3.10. Variações patológicas de PCR

Como já foi referido anteriormente, as concentrações de proteína C reactiva vão aumentar quando o organismo se encontra na presença de uma infecção, lesão tissular, trauma ou cirurgia, crescimento neoplásico ou alterações inflamatórias (Gordon e Koy, 1985 citado por Gruys et al., 2005a). A concentração de PCR pode variar em função da extensão dos tecidos lesados, dos agentes infecciosos envolvidos, da presença de processo inflamatórios concomitantes, da duração (cronicidade) e do tipo de doença (Hansson e Lindquist, 1997 citado por Gillet, 2002).

Uma vez que a descoberta da proteína C reactiva está relacionada com o aumento desta em pacientes que apresentavam uma infecção por *Streptococcus pneumoniae*, será sempre de esperar uma síntese desta proteína na presença de infecções bacterianas.

Yamamoto et al. (1994) realizaram um estudo com o objectivo de avaliar a resposta da proteína C reactiva perante uma infecção bacteriana. Foi administrado a quatro cães, da raça Beagle, com 2 anos, uma suspensão contendo 5×10^9 células de *Bordetella bronchiseptica*, por via intrabronqueal. Às 24 horas, verificou-se um elevado aumento desta proteína, estando os valores compreendidos entre 385 e 720 µg/ml (Gillet, 2002). Mais recentemente, Hayashi et al. (2001) inocularam por via intradérmica *Staphylococcus aureus*, em quatro cães com 1 mês de idade. As concentrações de proteína C reactiva foram medidas através do método ELISA, verificando-se que estas atingiram um pico às 24 horas, com valores compreendidos entre 61,8 e 98,1 µg/ml e que a recuperação se iniciou a partir do 5º dia.

Estes dois estudos demonstram que a síntese da proteína C reactiva é fortemente activada na presença de uma infecção bacteriana. Os valores significativamente inferiores no segundo estudo podem ser devidos à idade dos animais, visto que, nos animais que apresentam idade inferior a três meses, a síntese de proteína C reactiva é muito inferior em relação aos restantes animais (Hayashi et al., 2001).

Tal como para as infecções bacterianas, a presença de parasitas num organismo também vai estimular a síntese de PCR, atingindo, esta, valores tão elevados como na presença de infecções bacterianas. A principal diferença é que o pico da concentração desta proteína

ocorre mais tarde do que nas infecções bacterianas, uma vez que alguns parasitas são microorganismos intracelulares e a sua multiplicação no organismo é mais lenta do que no caso das bactérias (Shimada et al., 2002), levando o organismo mais tempo a desenvolver uma resposta. Shimada et al. (2002) administraram por via endovenosa, *Ehrlichia canis*, a cinco cães da raça Beagle. As concentrações de proteína C reactiva começaram a aumentar entre o 4º e o 16º dia, atingindo um pico entre o 15º e 62º dia. As concentrações médias neste pico foram de 452,6 µg/ml, altura a partir do qual os valores desta proteína começaram a diminuir, atingindo valores basais a partir do 90º dia. Num outro estudo, em que foi utilizado *Trypanosoma brucei*, verificou-se que a PCR atingiu um pico entre o 7º e o 10º dia com concentrações superiores a 200 µg/L (Ndung'u et al., 1991 citado por Gillet, 2002).

A presença de infecções virais, só por si, não vai alterar as concentrações de PCR. Jinbo et al. (1999) realizaram um estudo em macacos, da espécie *Macaca irus*, para avaliar a resposta da proteína C reactiva após administração de *Bordetella bronchiseptica* e duas estirpes do vírus do sarampo, de forma a poder comparar a resposta desta proteína em infecções bacterianas e virais. Os valores obtidos nos animais aos quais foi administrado *Bordetella bronchiseptica* variaram entre 102,4 e 313,4 µg/ml, 54 a 96 vezes superiores aos valores normais, enquanto que nos animais inoculados com as estirpes virais não houve qualquer aumento da síntese de proteína C reactiva, mantendo-se as suas concentrações sempre dentro dos valores normais. Em 2001, após administração a quatro cães de uma vacina comercial que continha estirpes vacinais para o vírus da esgana, adenovírus do tipo 2, vírus parainfluenza e parvovírus, verificou-se que também não havia qualquer tipo de alteração nos valores da proteína C reactiva (Hayashi et al., 2001). Conclui-se, assim, que não parece existir qualquer aumento na síntese da proteína C reactiva induzida por infecções virais, e que, se houver aumento, este estará, provavelmente, associado a infecções bacterianas secundárias muitas vezes concomitantes com as infecções virais (Jinbo et al., 1999).

Ao induzir inflamação na mucosa gástrica através da administração de ácido acetilsalicílico, indometacina e cloreto de sódio, Otabe et al. (2000), observaram que as concentrações de PCR aumentavam. Estes resultados estão de acordo com os de Hayashi et al. (2001) que, ao administrar óleo de terebentina, verificaram que houve um grande aumento da proteína entre o 1º e o 4º dia, comprovando, assim, que a presença de inflamação conduz à síntese de PCR.

Uma vez que numa intervenção cirúrgica existe sempre um processo inflamatório ao nível dos tecidos, será sempre de esperar um aumento da proteína C reactiva, variando, este, consoante o tipo de cirurgia. Yamamoto et al. (1993) realizaram um estudo em 29 animais sujeitos a diferentes tipos de cirurgia (ovariorrectomia convencional e devido a piómetra, ortopedia, extracção dentária e remoção de um tumor superficial). As concentrações de

PCR antes da cirurgia, à excepção dos animais que vieram para ovariectomia convencional, apresentaram-se com valores superiores aos normais, uma vez que já manifestavam sinais de inflamação. As concentrações séricas desta proteína apresentaram valores muito elevados às 24-48 horas, sendo os valores médios no momento do pico de 383,2 µg/ml para as ortopedias, 249,2 µg/ml nas extracções de tumores superficiais, 181,6 µg/ml para as ovariectomias por piómetra e 136,2 µg/ml para as ovariectomias convencionais. O tipo de intervenção cirúrgica, reflecte a gravidade e extensão das lesões tissulares (Caspi et al., 1984), sendo o aumento superior quando há uma maior manipulação muscular ou da medula óssea, como é o caso das ortopedias (Yamamoto et al. 1993b).

Hayashi et al. (2001) ao realizar uma ovariectomia convencional em cinco cães verificaram que os valores da proteína C reactiva também atingiram um pico às 24 horas, apresentando valores entre 105,8 mg/L e 199,0 mg/L, confirmando assim os resultados obtidos por Yamamoto et al. (1993).

Foi realizado um outro estudo em 67 cães que apresentavam diferentes tipos de tumor (16 com linfoma, 11 com leucemia linfoblástica aguda, 7 com leucemia linfoblástica crónica, 8 com mieloma múltiplo e 25 controlos) (Mischke et al., 2006). Os valores obtidos variaram consoante o tipo de tumor, obtendo-se como valores médios para o linfoma 37,2 µg/ml, para a leucemia linfoblástica aguda 47,8 µg/ml, para a leucemia linfoblástica crónica 35,5 µg/ml, para o mieloma múltiplo 17,6 µg/ml e para a população controlo 1,67 µg/ml. Os resultados indicam que, quanto mais severo é o tipo de tumor, mais elevadas serão as concentrações de PCR, podendo estes valores ajudar no prognóstico de uma neoplasia. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Caspi et al. (1984) onde se verificou que em diferentes tipos de tumores mamários, as concentrações de proteína C reactiva eram significativamente mais elevadas em animais com tumores malignos do que os que apresentavam neoplasias benignas. Também se verificou que os animais que apresentavam tumores malignos com metástases, os seus valores eram superiores do que os que não apresentavam qualquer tipo de metástase (Gillet, 2002). Normalmente, os valores de PCR associados a alterações neoplásicas, são proporcionais à evolução do processo, estando relacionados com o grau de neoplasia, com o prognóstico e com a taxa de sobrevivência (Mazhar e Ngan, 2006).

3.11. PCR como parâmetro laboratorial

As proteínas de fase aguda, onde se inclui a proteína C reactiva, podem servir como meios auxiliares de monitorização da saúde animal. Devido ao seu tempo de vida relativamente curto e à sua resposta expressiva em animais com alterações patológicas, as concentrações desta proteína constituem uma medição válida da resposta sistémica a um determinado estímulo. Tal como a temperatura ou a frequência cardíaca, a utilização de PCR não é

suficiente para estabelecer um diagnóstico definitivo, uma vez que é um marcador inespecífico de inflamação, podendo, no entanto, fornecer informação objectiva sobre a extensão do processo.

Esta falta de especificidade representa uma limitação, mas ao mesmo tempo uma vantagem do ponto de vista do diagnóstico, uma vez que um aumento da concentração desta proteína indica que o organismo está a combater um processo potencialmente perigoso.

A PCR pode ser útil na avaliação da presença, extensão e gravidade de processos patológicos ou alterações no organismo, no diagnóstico diferencial, na verificação da eficácia de um tratamento (Matijatko et al., 2007), no diagnóstico de complicações, como meio de detecção precoce de alterações, contribuindo para a sua prevenção e com propósitos de prognóstico, uma vez que a duração e magnitude da resposta reflecte a gravidade da doença (Petersen et al., 2004).

A síntese de PCR difere em função da etiologia da patologia. Ao quantificar esta proteína em processos que podem ter origem viral ou bacteriana, como as meningites, iremos obter valores significativamente superiores no segundo caso, uma vez que as infecções virais não induzem a síntese da proteína C reactiva, sendo assim possível instituir uma terapêutica mais adaptada e eficaz, evitando a instituição de terapêutica antimicrobianas desnecessárias (Dela Cruz et al., 2001). Deve ter-se sempre em conta que, por vezes, as infecções virais promovem a presença de infecções bacterianas secundárias, estando naturalmente os valores de PCR aumentados nestes casos. Assim, devem realizar-se exames complementares de forma a confirmar o diagnóstico (Singh, 1994).

Quando o objectivo é a monitorização de um tratamento a quantificação contínua de PCR pode ter grande utilidade. Depois de se instituir a terapêutica adequada, podem surgir quatro situações específicas em relação às concentrações desta proteína: (1) descida rápida e exponencial, (2) descida lenta e insidiosa, (3) ausência de descida e (4) existência de um segundo pico. A presença de uma descida rápida e exponencial, é indicativa de uma terapêutica adequada e da ausência de alterações. O animal não necessita de monitorização contínua, sendo apenas necessário quantificar a proteína C reactiva para verificar até quando se deve continuar a terapêutica. Tanto na segunda como na terceira situação, o animal necessita uma monitorização cuidada, uma vez que pode haver suspeita de que o tratamento não seja o mais adequado ou que possam existir outras alterações concomitantes. A quantificação de PCR deve ser regular de forma a avaliar a evolução. Por último, quando há um segundo pico nas concentrações, deve haver uma monitorização constante do animal, com uma alteração do tratamento e uma recolha de novos sinais para uma patologia concomitante. O prognóstico neste caso é bastante reservado (Póvoa, 2000). Em medicina humana, considera-se que quando há um aumento ou uma estabilização da concentração de PCR durante os três ou quatro dias após a instituição da terapêutica, há uma evolução desfavorável e o tratamento deve ser reconsiderado (Hansson e Lindquist,

1997 citado por Gillet, 2002). Foram realizados diversos estudos em medicina veterinária com o objectivo de avaliar a eficácia dum tratamento para determinada patologia (Kjelgaard-Hansen et al., 2006; Martinez-Subiela e Ceron, 2005b; Sasanelli et al., 2007; Matijatko et al., 2007). Em todos, depois de se instituir a terapêutica correcta, quantificou-se a PCR em intervalos de tempo definidos, e verificou-se que esta apresentou concentrações progressivamente menores ao longo do tempo.

A avaliação dos ratios entre proteínas de fase aguda positivas e negativas, também pode ser útil na determinação da eficácia de um tratamento. Num estudo realizado, usaram-se vários ratios entre diferentes proteínas de fase aguda para verificar a eficácia do tratamento para leishmaniose com antimoniato de meglubina e alopurinol. Os ratios utilizados foram: PCR/ALB (ratio PCR e albumina), PCR*SAA/ALB, (ratio PCR, proteína amilóide A sérica e ALB) PCR*HP/ALB (ratio PCR, haptoglobina e ALB) e PCR*CP/ALB (ratio PCR, ceruloplasmina e ALB), sendo o mais fiável o que relacionou a PCR com a CP e a ALB, aumentando a sensibilidade do resultado comparativamente com a utilização de PCR isolada ou com outras PFA. De qualquer forma, estes ratios devem ser interpretados de acordo com as diferentes doenças, uma vez que estas podem condicionar os resultados obtidos (Martinez-Subiela e Ceron, 2005b).

Por vezes, o diagnóstico de complicações torna-se complexo uma vez que, inicialmente, grande parte dos sintomas é subjectiva. Knapp et al. (2001) observaram que em 99 animais sujeitos a uma cirurgia, os que apresentaram infecção da zona da sutura ou deiscência dos pontos, as concentrações de PCR não diminuíram, ao contrário dos restantes animais que não tiveram qualquer tipo de complicações.

Fransson et al. (2004) concluíram que a associação da contagem de neutrófilos e da avaliação da concentração plasmática da proteína C reactiva, tinha uma elevada sensibilidade na detecção da presença de piómetra relativamente à hiperplasia quística endometrial. Em 2006 Fransson et al. analisaram a concentração plasmática de proteína C reactiva, do TNF α e da interleuquina-6 em cadelas com piómetra e com síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS). Concluíram que a proteína C reactiva, independentemente da variação individual, era um bom marcador inflamatório de SIRS. Além disso, quando ocorreu o estado de SIRS, as elevadas concentrações de proteína C reactiva e a elevada temperatura corporal eram indicativas de uma elevada morbilidade que reflectiu a duração da hospitalização.

As maiores limitações da utilização da proteína C reactiva são a baixa especificidade e elevado custo de cada análise. Este último aspecto será ultrapassado no futuro, uma vez que existem cada vez maior número de métodos prontos a utilizar na área clínica. Futuros estudos indicarão um limite de positividade que consiga discriminar animais com processos inflamatórios, de outros com patologias para além de inflamação de forma aumentar a especificidade (Paltrinieri, 2007).

4. Ausência de reacção cruzada entre PCR canina e PCR humana

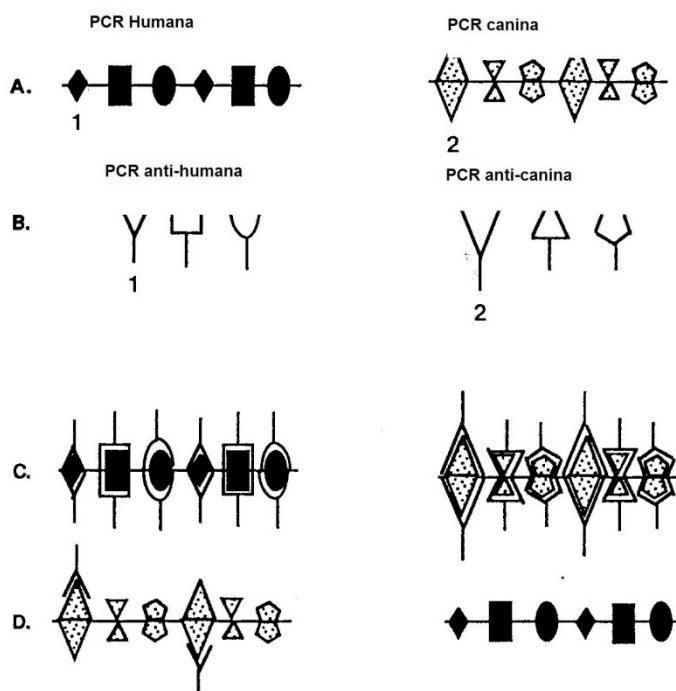
4.1 Introdução

No Homem a proteína C reactiva é uma das proteínas de fase aguda cuja concentração, após um estímulo inflamatório, pode aumentar até 1000 vezes (Black, 2005). Esta proteína tem sido reconhecida como um indicador, que permite avaliar, a gravidade de uma inflamação (Yamamoto et al., 1993b), sendo reconhecida como um parâmetro essencial na examinação clínica em Medicina Humana (Kuribayashi et al., 2003).

A existência da proteína C reactiva canina análoga à PCR humana foi confirmada por Caspi et al. em 1984. Desde então têm sido realizados diversos estudos que demonstram o papel desta como marcador de inflamação, visto estar aumentada na presença de infecções (Fransson et al., 2004; Shimada et al., 2002; Matijatko et al., 2007), traumas cirúrgicos (Yamamoto et al., 1993b, Otabe et al., 1998), neoplasias (Mischke et al., 2006) e inflamações de origem não infecciosas (Hayashi et al., 2001; Holm et al., 2004, Chambers et al., 1991, Otabe et al., 2000). No entanto, encontra-se demonstrado que a antigenicidade da proteína C reactiva canina difere da humana, tendo Yamamoto et al. (1993) verificado não ser possível utilizar testes comerciais humanos para a determinação de PCR canina (figura 3).

Neste estudo, foi efectuada a quantificação e a avaliação da evolução da proteína C reactiva canina depois de diversas intervenções cirúrgicas, através do método da imunoturbidimetria, utilizando um método comercializado para medicina humana. Uma vez que as concentrações de PCR atingem um pico às 24-48h e voltam aos valores normais ao fim de 7-8 dias, foram recolhidas amostras em quinze animais sujeitos a intervenções cirúrgicas antes, 24 horas e 8 dias depois da cirurgia. As amostras recolhidas foram enviadas para o laboratório DNAtch para quantificação de PCR, sendo clara a identificação da espécie a partir da qual se recolheram as amostras.

Figura 3: representação esquemática da reacção de antigenicidade entre os anticorpos anti-PCR humana e a PCR canina



A – antígenios das moléculas de PCR canina e de PCR humana; B – anticorpos produzidos contra a PCR canina e humana; C – reacção entre os anticorpos anti-PCR humana (B₁) e PCR humana (epitopo A₁) e entre os anticorpos anti-PCR canina (B₂) e a PCR canina (epitopo A₂); D – reacção dos anticorpos anti-PCR humana (B₁) com a PCR canina (epitopo A₂) e a ausência de reacção entre os anticorpos anti-PCR canina (B₂) e a PCR humana (epitopo A₁). O esquema sugere que a reacção do anticorpo B₁ produzida contra o epitopo A₁ na PCR humana pode reagir com o epitopo A₂ na PCR canina, porque o epitopo A₂ é parcialmente semelhante com a estrutura de PCR humana. No entanto, o anticorpo B₂ resultante do epitopo A₂ na PCR canina não podem reagir com o epitopo A₁ na PCR humana, porque o anticorpo B₂ é estruturalmente mais largo para reagir com o epitopo A₁ (adaptado de Yamamoto et al., 1993a).

4.2 Materiais e métodos

4.2.1. Animais

Neste estudo foram utilizados quinze cães que se apresentaram para uma consulta no Hospital Veterinário do Restelo e que foram encaminhados para cirurgia. O grupo incluiu onze fêmeas e 4 machos, de raças variadas, com idades compreendidas entre os 7 meses e os 13 anos.

A tabela 14 resume as características gerais de cada animal e o tipo de cirurgia a que foram sujeitos.

Tabela 14: Género, idade, raça, tipo de cirurgia e outras alterações dos animais utilizados para o estudo clínico

Animal	Género	Idade	Raça	Cirurgia	Outras alterações
1	Fêmea	6 Anos	Epagneul Breton	OVH por piómetra	Pielonefrite
2	Macho	10 Anos	Labrador	Hérnia perineal	-
3	Fêmea	2 Anos	Indeterminada	OVH electiva	-
4	Fêmea	5 Anos	Indeterminada	OVH electiva	-
5	Macho	9 Anos	Husky Siberiano	Hemilaminectomia direita (L6-L7)	<i>Rickettsia conorii</i>
6	Fêmea	9 Anos	Indeterminada	Resolução de hérnia inguinal bilateral + ovariectomia + mastectomia lado esquerdo	-
7	Macho	7 Meses	Bulldog Francês	Trocleoplastia + imbricamento do retináculo lateral (luxação patelar medial)	Demodex
8	Fêmea	1 Ano	Caniche	OVH electiva	-
9	Fêmea	13 Anos	Indeterminada	Mastectomia parcial caudal esquerda + extirpação massa pediculada na zona do cérvix (fibroma)	-
10	Fêmea	10 Anos	Serra da Estrela	OVH por piómetra + extirpação massa vaginal (leiomioma) + extirpação massa cérvix (fibropapiloma) + extirpação nódulo mamário (carcinoma sólido tubular)	-
11	Macho	8 Anos	Indeterminada	Redução cirúrgica de luxação coxo-femoral direita	Fractura cominutiva do fémur esquerdo + <i>Babesia spp</i> + <i>Rickettsia conorii</i>

Tabela 14 (continuação)

Animal	Género	Idade	Raça	Cirurgia	Outras alterações
12	Fêmea	3 Anos	Indeterminada	OVH electiva + extirpação de massa vaginal (tumor venéreo transmissível – Sticker)	-
13	Fêmea	2 Anos	Boxer	OVH electiva	-
14	Fêmea	10 Anos	Indeterminada	OVH electiva + mastectomia parcial (Carcinoma tubular papilífero)	Diabetes mellitus + hipoadrenocorticismo
15	Fêmea	8 Anos	Dogue de Bordéus	Extirpação de massa perianal (dermatite e paniculite piogranulomatosas)	

4.2.2. Análises hematológicas

Antes da cirurgia foram recolhidas amostras de sangue de cada animal para a realização de hemograma (contagem de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas) e de análises bioquímicas de rotina (ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina transaminase, proteínas totais e glucose) utilizando os analisadores automáticos, MS4 e Spotchem EZ SP-4430, respectivamente.

4.2.3. Recolha de amostras para quantificação de PCR

A cada animal foram recolhidos 4 ml de sangue, da veia jugular ou da veia cefálica, para um tubo seco. As amostras foram recolhidas imediatamente antes do início da intervenção cirúrgica (T_0), 24 horas (T_1) e 8 dias (T_2) depois da cirurgia. Quinze minutos depois de cada recolha, o sangue foi centrifugado e o soro obtido foi congelado a -20°C para posterior determinação de teores de PCR.

4.2.4. Técnica de análise

A técnica utilizada no laboratório para o qual se enviaram as amostras consistiu na utilização de testes comerciais destinados à quantificação de PCR humana. A concentração de PCR foi determinada pelo método imunoturbidimétrico wide range C-reactive protein (wr-CRP) (Anexo 1). O método mede o teor sérico de proteína C reactiva, baseando-se no princípio de que a concentração da amostra é função da intensidade da dispersão de luz originada por agregados de látex. As partículas de látex de polistireno revestidas com anticorpos anti-PCR aglutinam-se rapidamente na presença da solução de conjugado de PCR, formando agregados, que resultam num aumento de turvação. Esta turvação é medida a 571 nm. A concentração de PCR é determinada através de uma curva de calibração gerada com os calibradores.

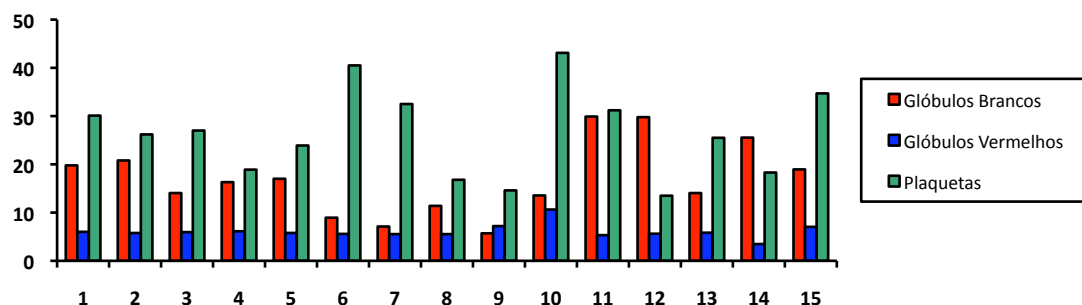
4.3. Resultados

4.3.1. Análises hematológicas

Antes das cirurgias os valores obtidos para o hemograma (gráfico 1) e bioquímicas (gráfico 2) diferiram de animal para animal (Anexo 2). As alterações mais observadas foram: leucocitose nos animais 1, 2, 11, 12, 14 e 15 devido à presença de infecção; insuficiência renal nos animais 1 e 2; aumento das proteínas totais no animal 11.

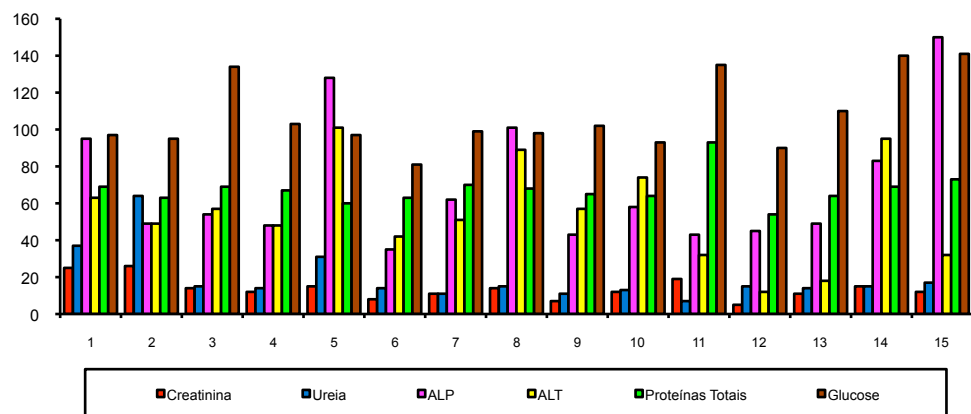
Os gráficos 1 e 2 representam os valores obtidos para cada animal.

Gráfico 1: Valores obtidos no hemograma realizados nos animais em estudo



Valores de referência: Glóbulos brancos – $6-17 \times 10^3/\mu\text{L}$; Glóbulos vermelhos – $5,5-8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$; Plaquetas: $12-60 \times 10^4/\mu\text{L}$

Gráfico 2: Valores obtidos nas bioquímicas realizadas nos animais em estudo



Valores de referência: Creatinina - <20 µg/dl; Ureia - <16 mg/dl; ALP - <147 UI/L; ALT - <120 UI/L; Proteínas Totais – 60-80 dg/dl; Glucose – 40-150 mg/dl

4.3.2. Valores da proteína C reactiva

As variações das concentrações da proteína C reactiva em T₀, T₁ e T₂ encontram-se nos gráficos de 3 a 15 (Anexo 3).

Gráfico 3: Variação da concentração de PCR no animal 1

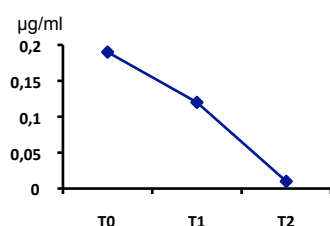


Gráfico 4: Variação da concentração de PCR no animal 2

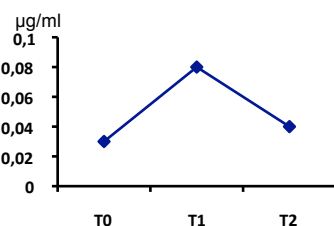


Gráfico 5: Variação da concentração de PCR no animal 3

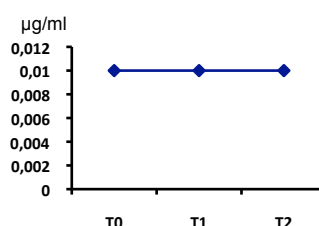


Gráfico 6: Variação da concentração de PCR no animal 4

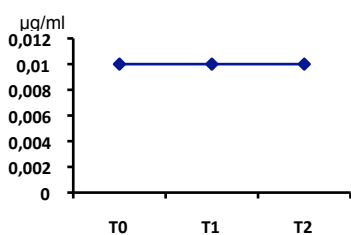


Gráfico 7: Variação da concentração de PCR no animal 5

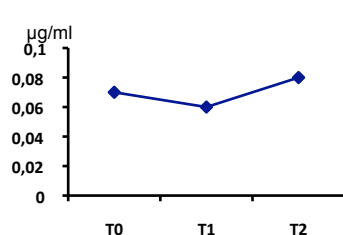


Gráfico 8: Variação da concentração de PCR no animal 6

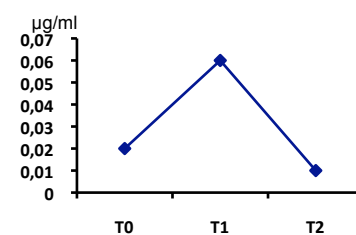


Gráfico 9: Variação da concentração de PCR no animal 7

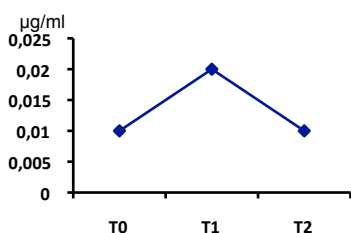


Gráfico 10: Variação da concentração de PCR no animal 8

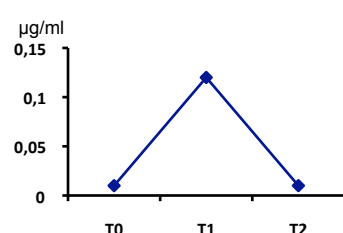


Gráfico 11: Variação da concentração de PCR no animal 9

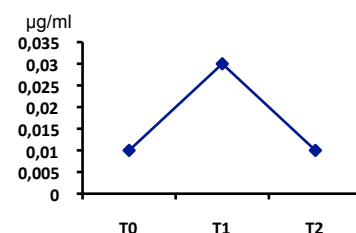


Gráfico 12: Variação da concentração de PCR no animal 10

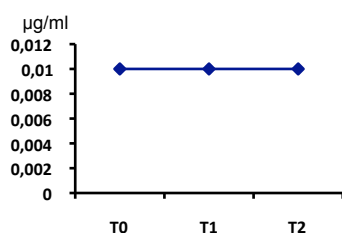


Gráfico 13: Variação da concentração de PCR no animal 11

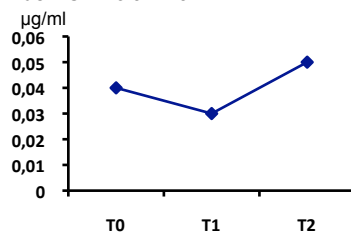


Gráfico 14: Variação da concentração de PCR no animal 12

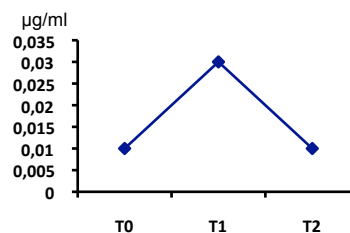


Gráfico 15: Variação da concentração de PCR no animal 13

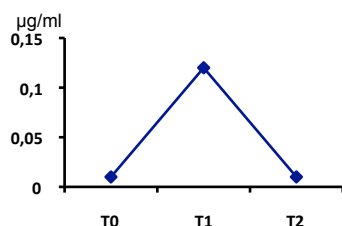


Gráfico 16: Variação da concentração de PCR no animal 14

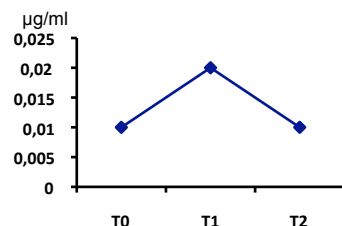
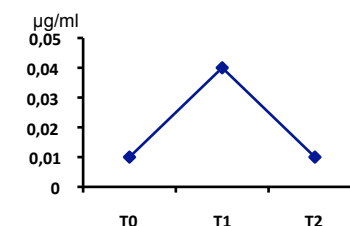


Gráfico 17: Variação da concentração de PCR no animal 15



Os valores de referência fornecidos pelo laboratório são entre 1,1 e 6,3 µg/ml. Todos os valores obtidos neste estudo foram muito inferiores aos valores de referência. O valor máximo foi de 0,19 µg/ml no animal 1 e o valor mínimo foi de 0,01 µg/ml em 12 dos animais.

4.4. Discussão

Sendo a proteína C reactiva uma proteína de fase aguda não específica, que aumenta na presença de inflamação (Hayashi et al., 2001), a evolução das suas alterações pode ser útil na detecção e monitorização de processos patológicos, na confirmação de eficiência de determinada terapêutica, como método auxiliar de diagnóstico ou na avaliação pós cirúrgica (Okamura et al., 1990 citado por Otabe et al., 2000).

Uma vez que os valores séricos de PCR, após um processo inflamatório, atingem um pico às 24-48 horas e retornam a valores normais ao fim de 7-8 dias, seria de esperar, neste estudo, que as concentrações desta proteína atingissem um valor máximo em T₁ e que tanto em T₀, como em T₂ apresentassem valores dentro dos parâmetros de referência. Tal não se verificou, uma vez que o laboratório ao realizar as determinações recorreu a um protocolo de medicina humana, a ligação antígeno-anticorpo não ocorreu, obtendo-se valores muito inferiores aos valores mínimos de referência.

Em 1993, Yamamoto et al. demonstraram que a PCR canina é antigenicamente diferente da PCR humana, não se podendo utilizar testes desenvolvidos para humanos na determinação das concentrações de PCR canina.

De acordo com Yamamoto et al. (1993a), para que ocorra reacção entre os anticorpos anti-PCR humana e a PCR canina, é necessário que a concentração desta última seja superior a 150 µg/ml. Assim pode concluir-se que, neste estudo, nenhuma das concentrações séricas de PCR presente nas amostras recolhidas era superior a este valor.

Embora, nove dos quinze casos estudados tivessem apresentado a evolução esperada, não é possível chegar a nenhuma conclusão sobre o comportamento da proteína C reactiva em animais submetidos a diferentes tipos de intervenções cirúrgicas, uma vez que os valores obtidos não são fiáveis. Foi, assim realizado, um novo estudo, com um protocolo desenvolvido para a medicina veterinária.

5. Alterações da proteína C reactiva sérica em cães sujeitos a intervenções cirúrgicas

5.1. Introdução

Em medicina humana, as proteínas de fase aguda são utilizadas como parâmetros de rotina para verificar a presença de inflamação ou infecção, a evolução de uma patologia ou a resposta a um determinado tratamento. Muitas proteínas plasmáticas sofrem aumentos da sua concentração quando se encontram na presença de estímulos inflamatórios, e na espécie canídea, a proteína C reactiva é considerada como a mais fiável e significativa (Eckersall, 2006a). Isto ocorre, não só devido ao seu aumento rápido e substancial depois de um estímulo inflamatório, como, devido ao curto tempo de semi-vida, as suas concentrações plasmáticas ou tissulares diminuem rapidamente após o término desse mesmo estímulo (Chambers et al., 1991).

Um diagnóstico precoce de infecção pós-cirúrgica é um dos factores de maior importância para melhorar os resultados da intervenção e assim ocorrer uma recuperação mais rápida dos pacientes. Existem diversos parâmetros utilizados para a detecção de infecções bacterianas no seguimento de pacientes cirúrgicos, sendo a contagem de leucócitos e a temperatura, os mais utilizados em medicina veterinária. No entanto, as proteínas de fase aguda também podem ser utilizadas com o mesmo propósito, sendo a proteína C reactiva o indicador mais estudado e fiável para a detecção de infecções bacterianas nos cães (Eckersall, 2006c), uma vez que a resposta desta é mais rápida do que os parâmetros anteriormente referidos (Hurter et al., 2005; Fransson et al., 2006).

O objectivo deste estudo é a quantificação sérica de proteína C reactiva canina depois de diversas intervenções cirúrgicas, e a sua comparação com valores pré-cirúrgicos. Uma vez que as concentrações de PCR atingem um pico às 24-48 horas, foram recolhidas amostras em dezassete animais, antes (T_0) e 24 horas (T_1) após a cirurgia. As amostras recolhidas foram enviadas para o laboratório DNAtch, onde se realizou o método ELISA para a sua detecção.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Animais

Neste estudo foram utilizados dezassete cães que se apresentaram para uma consulta no Hospital Veterinário do Restelo e que foram encaminhados para cirurgia. O grupo incluiu dez fêmeas e sete machos, de raças variadas, com idades compreendidas entre os 6 meses e os 14 anos.

A tabela 15 resume as características gerais de cada animal e o tipo de cirurgia a que foram sujeitos.

Tabela 15: Género, idade, raça, tipo de cirurgia e outras alterações dos animais utilizados para o estudo clínico

Animal	Género	Idade	Raça	Cirurgia	Outras alterações
1	Fêmea	6 Meses	Cruzado de Pitt Bull	OVH electiva	-
2	Fêmea	14 Anos	Cruzado de Perdigueiro	Extirpação de massa subcutânea (hemangiopericitoma)	-
3	Fêmea	8 Anos	Chow Chow	OVH por piómetra	-
4	Macho	6 Anos	Cruzado de Labrador	Osteossíntese de fractura cominutiva do fémur direito proximal	-
5	Macho	11 Anos	Serra da Estrela	Resolução de hérnia perineal bilateral + omentalização de quisto paraprostático + colonopexia + cistopexia + prostatopexia	-
6	Macho	8 Anos	Husky	Resolução de hérnia perineal bilateral + colonopexia	-
7	Fêmea	10 Anos	Indeterminada	OVH por piómetra	Degenerescência mixomatosa da mitral

Tabela 15 (Continuação)

Animal	Género	Idade	Raça	Cirurgia	Outras alterações
8	Fêmea	14 Anos	Indeterminada	OVH + Extirpação do pólo cranial da bexiga (necrose com degenerescência das fibras musculares) + extirpação de nódulo mamário (fibrossarcoma)	Hiperadrenocorticismo
9	Fêmea	11 Anos	Golden Retriever	OVH + extirpação de massa vaginal (leiomioma)	-
10	Fêmea	13 Anos	Labrador	OVH por piómetra	-
11	Fêmea	12 Anos	Yorkshire Terrier	Mastectomia parcial do lado esquerdo (fibroadenoma de baixa celularidade)	-
12	Macho	8 Anos	Airedale Terrier	Orquiectomia	Hiperplasia prostática + quistos prostáticos
13	Macho	9 Anos	Teckel	Laparotomia exploratória por suspeita de CE	-
14	Fêmea	8 Anos	Boxer	OVH por aborto	-
15	Macho	10 Anos	Indeterminada	Laparotomia exploratória por suspeita de CE	-
16	Fêmea	6 Meses	Cruzado de labrador	Laparotomia exploratória por suspeita de CE	-
17	Macho	9 Anos	Cocker Spaniel	Orquiectomia	Hiperplasia prostática + quisto prostático

Os animais foram distribuídos em sete grupos consoante o tipo de cirurgia: ovariectomia electiva (n=1), ovariectomia por piómetra ou aborto (n=4); cirurgia ortopédica (n=1), extirpação de massa (n= 4), resolução de hérnia perineal (n=2), laparotomia exploratória (n=3) e orquiectomia (n=2).

5.2.2. Análises hematológicas

Antes da cirurgia foram recolhidas amostras de sangue de cada animal para a realização de hemograma (contagem de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas) e de análises bioquímicas de rotina (ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina transaminase, proteínas totais e glucose) utilizando os analisadores automáticos, MS4 e Spotchem EZ SP-4430, respectivamente.

5.2.3. Recolha de amostras para quantificação de PCR

A cada animal foram recolhidos 4 ml de sangue, da veia jugular ou da veia cefálica, para um tubo seco. As amostras foram recolhidas imediatamente antes do início da intervenção cirúrgica (T_0) e 24 horas após cirurgia (T_1). Quinze minutos depois de cada recolha, o sangue foi centrifugado e o soro recolhido foi congelado a -20°C para posterior determinação de teores de PCR.

5.2.4. Técnica de análise

A concentração de PCR foi determinada pelo método ELISA, utilizando a técnica sandwich. Foi utilizado um teste comercial – “PHASETM RANGE” Canine C-Reactive Protein Assay – produzido pela Tridelta Development Limited, Irlanda (Anexo 4).

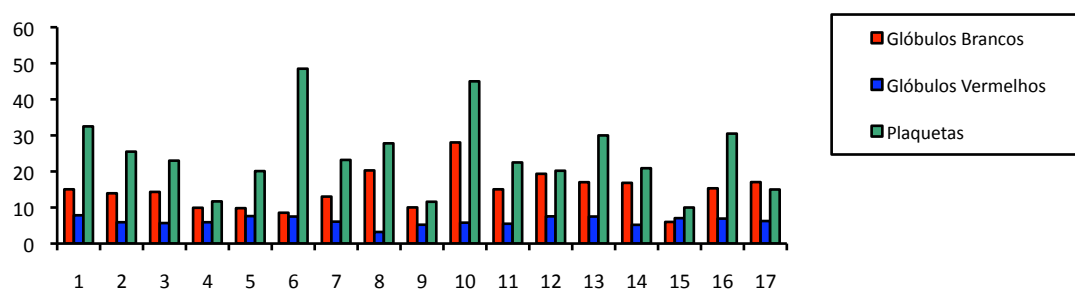
Este teste consiste num método imunoenzimático em fase sólida, em que a placa de 96 pocilhos se encontra revestida por ligandos de PCR. Para a quantificação de PCR os soros são diluídos a 1:500 em solução tampão e distribuídos na placa. Durante um período de incubação de 15 minutos a 37°C , a PCR une-se aos ligandos. Após quatro lavagens sucessivas, de forma a eliminar os constituintes do soro que não se uniram aos ligandos, adicionam-se os anticorpos anti-PCR canina, marcados com peroxidase. Depois, após o mesmo tempo de incubação e lavagens, adiciona-se o substracto (peróxido de hidrogénio) e o cromogénio (tetrametil benzidina, TMB). A peroxidase ligada aos anticorpos anti-PCR reage com o peróxido de hidrogénio, libertando oxigénio, que vai oxidar a TMB, originando uma cor azulada nos pocilhos que continham soro com PCR detectável. Ao adicionar uma solução “stop” (ácido sulfúrico 1M), ocorre uma paragem da reacção, e os pocilhos ficam com cor amarela. A absorvência é lida em cada pocilho com um comprimento de onda de 450 nm, sendo a positividade da reacção directamente proporcional ao teor sérico em PCR.

5.3. Resultados

5.3.1. Análises hematológicas

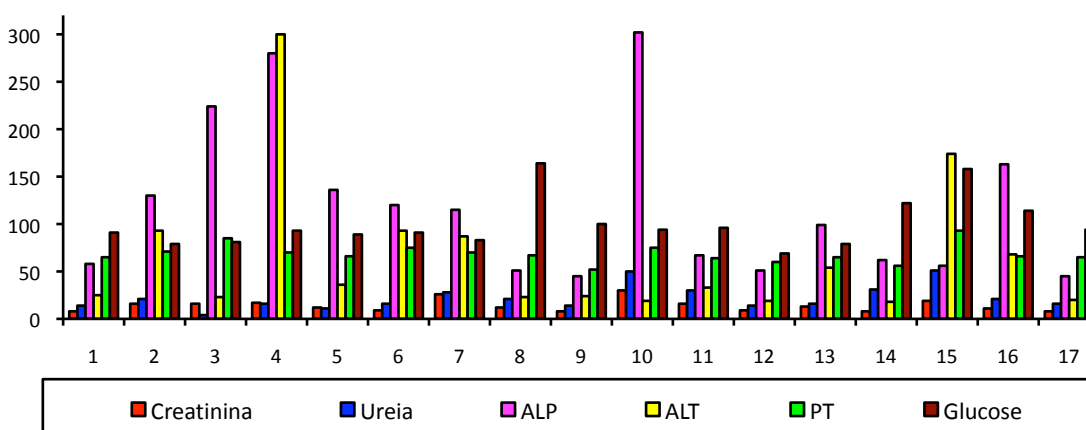
Antes das cirurgias, os valores obtidos para o hemograma (gráfico 18) e bioquímicas (gráfico 19) diferiram de animal para animal (anexo 5). As alterações observadas foram: leucocitose nos animais 8, 10 e 12 devido à presença de infecção; insuficiência renal pré-azotêmica ou azotêmica nos animais 7 e 10; alteração das enzimas hepáticas nos animais 3, 4 e 10, 15 e 16; aumento dos valores de PT dos animais 3 e 15 provavelmente por desidratação.

Gráfico 18: Valores obtidos no hemograma realizado aos animais em estudo



Valores de referência: Glóbulos brancos – $6-17 \times 10^3/\mu\text{L}$; Glóbulos vermelhos – $5,5-8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$; Plaquetas: $12-60 \times 10^4/\mu\text{L}$

Gráfico 19: Valores obtidos nas análises bioquímicas sanguíneas realizadas aos animais em estudo

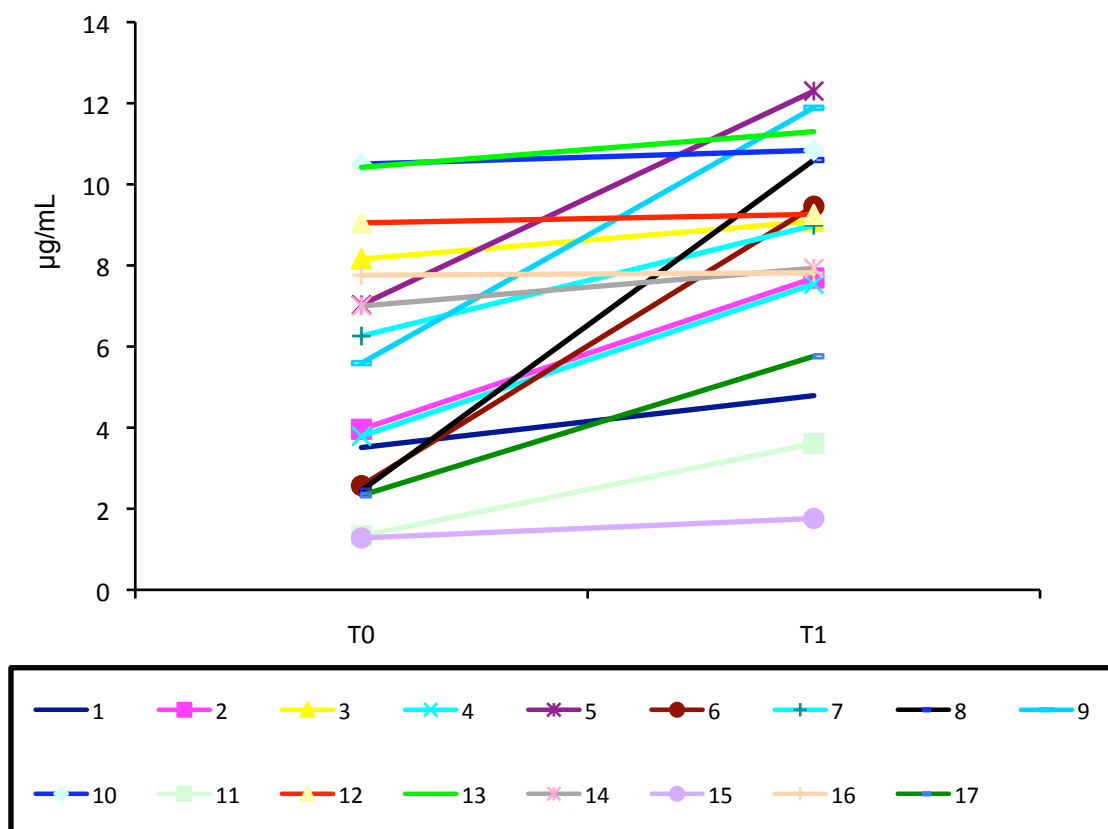


Valores de referência: Creatinina - $<2 \times 10 \text{ cg/dl}$; Ureia - $<16 \text{ mg/dl}$; ALP - $<147 \text{ UI/L}$; ALT - $<120 \text{ UI/L}$; Proteínas Totais - $60-80 \text{ dg/dl}$; Glucose - $40-150 \text{ mg/dl}$

5.3.2. Valores da proteína C reactiva

As variações das concentrações da proteína C reactiva em T₀ e T₁ encontram-se no gráficos de 20 (Anexo 6). Os valores de referência variam entre 1.1 e 6.3 µg/ml.

Gráfico 20: Variações da proteína C reactiva antes (T₀) e 24 horas depois da cirurgia (T₁) nos animais em estudo.



A tabela 16 apresenta a cinética do teor sérico de PCR, relacionada com o tipo de cirurgia e as alterações hematológicas e bioquímicas observadas.

As concentrações séricas da proteína C reactiva quantificadas antes da cirurgia (T₀) apresentaram-se superiores aos valores de referência, nos animais que apresentavam processos inflamatórios e/ou infecciosos. Estes ocorreram nos animais que foram sujeitos a OVH por piómetra ou por aborto (3, 7, 10 e 14), no animal sujeito a uma resolução de hérnia perineal com a presença de um quisto paraprostático de grandes dimensões (5), no animal sujeito a orquiectomia por apresentar hiperplasia prostática juntamente com quistos prostáticos (12) e nos dois animais sujeitos a laparotomia exploratória por presença de corpo estranho intestinal (13 e 16). Os restantes animais apresentaram concentrações dentro dos valores de referência antes da cirurgia.

Vinte e quatro horas após a cirurgia, todos os animais apresentaram um aumento da concentração sérica de PCR. Os valores médios obtidos para cada grupo de cirurgia foram:

4,79 µg/ml na OVH electiva, 8,45 µg/ml na extirpação de massas, 9,22 µg/ml nas OVH por piómetra ou aborto, 7,54 µg/ml na cirurgia ortopédica, 10,88 µg/ml na resolução das hérnias, 7,51 µg/ml nas orquiectomias e 6,96 µg/ml nas laparotomias exploratórias.

A maior diferença média entre T₀ e T₁ foi encontrada no grupo de animais submetido a cirurgia para resolução de hérnias (6,08 µg/ml), seguido de 5,12 µg/ml nas extirpações de massas, 3,75 µg/ml na cirurgia ortopédica, 1,82 µg/ml nas orquiectomias, 1,28 µg/ml na OVH electiva, 1,23 µg/ml nas OVH por piómetra ou aborto e 0,47 µg/ml nas laparotomias exploratórias.

Tabela 16: Relação das concentrações séricas de PCR (em µg/dl) com as análises hematológicas e bioquímicas para cada animal sujeito a uma intervenção cirúrgica.

Cirurgia	Animal	Hemograma	Bioquímicas	PCR T ₀	PCR T ₁	T ₁ -T ₀
OVH electiva	1			3,51	4,79	1,28
OVH por piómetra ou aborto	3		AH + PT↑	8,16	9,09	0,93
	7		IR	6,30	8,99	2,73
	10	Leucocitose	IR + AH	10,50	10,84	0,34
	14			7,00	7,93	0,93
Cirurgia ortopédica	4		AH	3,79	7,54	3,75
Extirpação de massa	2			3,96	7,69	3,73
	8	Leucocitose		2,45	10,60	8,15
	9		PT↓	5,59	11,89	6,3
	11			1,33	3,61	2,28
Resolução de hérnia perineal	5			7,03	12,30	5,27
	6			2,57	9,46	6,89
Laparotomia exploratória	13			10,42	11,30	0,88
	15		AH + PT↑	1,28	1,76	0,48
	16			7,76	7,82	0,06
Orquiectomia por hiperplasia prostática	12	Leucocitose		9,05	9,26	0,21
	17			2,33	5,76	3,43

IR – Insuficiência renal; AH – Alterações hepáticas; PT – Proteínas Totais

As células sombreadas indicam os valores de PCR superiores a 6,3 µg/dl (colunas PCR T₀ e PCR T₁) e as variações mais expressivas entre as duas colheitas (coluna T₁-T₀)

5.4. Discussão

A proteína C reactiva é uma proteína de fase aguda produzida no fígado quando o organismo reage a qualquer tipo de processo inflamatório, seja ou não de natureza infecciosa (Hurter et al., 2005). De todas as proteínas de fase aguda, foi demonstrado que a PCR é a que responde mais rapidamente após uma cirurgia, apresentando no cão uma elevação maior que a verificada para outras proteínas (Conner et al., 1988 citado por Yamamoto et al., 1993b).

O presente estudo foi realizado em 17 animais, submetidos a diversos tipos de cirurgia. Uma vez que a amostra é manifestamente insuficiente para estabelecer correlações estatisticamente significativas entre teores séricos de PCR e tipo de cirurgia, optou-se pela organização dos dados apresentados de acordo com o tipo de cirurgia efectuada, por se tornar mais fácil a interpretação dos resultados.

Alguns animais em estudo tinham uma história clínica e sintomas compatíveis com a existência de processos inflamatórios e/ou infecciosos em curso, tais como piómetra, hérnia perineal e hiperplasia prostática, razão pela qual foram sujeitos a uma intervenção cirúrgica. Outros animais foram sujeitos a cirurgia electiva (ovariohisterectomia) ou a resolução de fracturas. Contudo, não se pode descartar a hipótese de alguns animais incluídos no presente estudo clínico poderem estar a desenvolver processos patológicos concomitantes não diagnosticados, uma vez que alguns foram referidos por outras clínicas, não sendo possível aceder a toda a história clínica. Tal situação, a verificar-se, teria influenciado as concentrações séricas da proteína C reactiva.

As amostras de sangue para determinação de PCR foram recolhidas imediatamente antes da cirurgia e no dia seguinte a esta, uma vez que, de acordo com a sua cinética, as concentrações séricas de PCR, após um estímulo inflamatório, atingem um pico às 24-48 horas (Gillet, 2002; Eckersall, 2006a).

Para a quantificação do teor sérico de PCR foi utilizado um teste disponível comercialmente, baseado no método de ELISA. Este método tem a capacidade de avaliar a presença de anticorpos ou antígenos numa amostra. A técnica sandwich vai permitir a utilização de amostras com uma concentração de antígenos baixa e/ou amostras contaminadas e apresenta uma sensibilidade superior à das técnicas directa ou indirecta (Male et al., 2006).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a literatura (Hayashi et al., 2001; Yamamoto et al., 1993b), tendo-se verificado, às 24 horas um aumento da concentração sérica de PCR em todos os animais, independentemente dos valores pré-cirúrgicos de PCR. Esta elevação ocorreu provavelmente devido à manipulação de tecidos e ao início do processo de cicatrização, uma vez que estes levam a processos inflamatórios, com consequente síntese de PCR (Knapp et al., 2001; Yamamoto et al., 1993b).

Alguns animais manifestaram valores iniciais de PCR acima dos limites considerados fisiológicos (até 6,3 µg/dl), devido à presença de processos inflamatórios e/ou infecciosos. Estes casos correspondem aos cães que foram sujeitos a uma intervenção cirúrgica pela presença piómetra ou aborto, suspeita de corpo estranho intestinal, hiperplasia prostática e hérnia perineal. Neste último, foi detectado a presença de um quisto paraprostático de grandes dimensões, aquando da cirurgia, justificando, assim, o valor elevado de PCR pré-cirúrgico.

Está descrito que, quanto maior for a manipulação cirúrgica dos tecidos, maior será o grau de inflamação (Yamamoto et al., 1993b). Nos animais utilizados neste estudo, verificou-se que o aumento de PCR estava relacionado com a intensidade do trauma cirúrgico, sendo a diferença entre T_0 e T_1 mais acentuada nos animais sujeitos a cirurgias mais agressivas e com maior manipulação de tecidos, ocorrendo, assim, um elevado grau de inflamação. Esta maior concentração verificou-se na cirurgia ortopédica, na qual houve intervenção dos tecidos e da medula óssea, na resolução das hérnias perineais, nas quais houve grande manipulação de tecidos musculares e em três casos de remoção de massas. No primeiro (animal 2) houve remoção de um tumor de elevado grau de malignidade, já com aderências aos tecidos subjacentes, no animal 8 houve remoção da porção cranial da bexiga e no último (animal 9) excisão de uma massa fortemente aderida à parede vaginal.

Embora algumas das concentrações pós-cirúrgicas mais elevadas que se obtiveram correspondam a animais com piómetra (animais 3, 7, 10 e 14), com hiperplasia prostática (animal 12) ou com presença de corpo estranho (animais 13 e 16), o aumento destes valores relativamente aos valores pré-cirúrgicos não sofreu uma elevação tão marcada como os referidos anteriormente, uma vez que estes animais já se apresentavam com uma inflamação e/ou infecção antes da cirurgia, apresentando valores de PCR pré-cirúrgicos já acima dos valores de referência.

De entre os dezassete cães sujeitos a cirurgia, os animais 1, 11, 15 e 17 apresentaram valores pós-cirúrgicos dentro dos valores de referência. Tal pode dever-se ao facto de estas cirurgias envolverem uma manipulação dos tecidos menos agressiva em relação às restantes ou pelo facto da amostra poder estar alterada, uma vez que se sabe que a presença de amostras lipémicas ou hiperbilirrubinémicas levam a uma diminuição da concentração da proteína C reactiva (Martinez-Subiela e Céron, 2005a).

Em medicina veterinária, a contagem de leucócitos é um dos marcadores inflamatórios mais utilizados (Nakaruma et al., 2008). A determinação da concentração sérica de PCR pode ser mais vantajosa do que a contagem de glóbulos brancos, uma vez que o seu tempo de semi vida é mais curto (Yamamoto et al., 1993b). Neste estudo verificou-se que os animais 3, 5, 7, 13, 14 e 16 apresentavam aumentos séricos de PCR pré-cirúrgicos e a contagem de leucócitos encontrava-se dentro dos parâmetros normais. Estes resultados podem dever-se ao facto dos valores séricos de PCR sofrerem alterações mais rápidas do que a contagem

de leucócitos (Nakamura et al., 2008), uma vez que as concentrações máximas de PCR ocorrem entre as 24 e as 48 horas (Eckersall, 2006a) e a maturação de neutrófilos demora cerca de 6 dias após a libertação dos seus antecessores pela medula óssea (Ettinger e Feldman, 2000).

Antes da realização de uma intervenção cirúrgica é aconselhável efectuar exames pré-cirúrgicos, tais como hemograma e bioquímicas de rotina, de forma a avaliar o estado geral do paciente. Nos animais em estudo, registou-se a alteração de alguns parâmetros bioquímicos, apresentando-se os animais 7 e 10 com sinais de insuficiência renal, os animais 3, 4, 10, 15 e 16 com sinais de alterações hepáticas e os animais 3 e 15 com aumento das proteínas totais. Na literatura consultada não se encontrou qualquer referência à existência de uma relação entre estas alterações e as concentrações séricas de PCR. Assim, não dispomos de dados suficientes para relacionar os aumentos de PCR dos animais em estudo com as alterações acima referidas.

Neste estudo, foi possível observar três evoluções diferentes das concentrações séricas de PCR: (1) valores de PCR em T_0 e T_1 dentro dos valores de referência, nos casos em que houve uma ligeira manipulação de tecidos; (2) valores de PCR em T_0 dentro dos valores de referência e em T_1 com grande aumento em relação ao limite fisiológico, devido a uma manipulação intensa dos tecidos e (3) valores de PCR em T_0 e T_1 superiores aos valores de referência, mas com uma diferença entre os dois tempos pouco expressiva.

Dentro de cada grupo de cirurgias, em alguns animais, a evolução de PCR diferiu relativamente aos restantes animais. Nos quatro animais sujeitos a extirpações de massas, o animal 11 não apresentou valores em T_1 tão elevados como nos outros casos, uma vez que a mastectomia parcial é um tipo de cirurgia menos agressiva do que as restantes. O animal 5, ao contrário do que seria de esperar, apresentou valores muito elevados em T_0 . Tal deveu-se ao facto de, durante a cirurgia, se ter detectado um quisto paraprostático de grandes dimensões, possivelmente responsável por um elevado grau inflamatório. No caso da laparotomia exploratória, os animais 13 e 16 apresentaram valores superiores em relação ao animal 15, provavelmente pelos primeiros apresentarem uma inflamação do tracto gastro-intestinal mais acentuada. Por último, o animal 12 apresentou valores superiores ao animal 17 pelo primeiro apresentar um elevado número de quistos prostáticos relativamente ao segundo. Contudo, não será de descartar, como já foi referido, a possibilidade das amostras estarem alteradas nos animais que apresentaram valores dentro dos parâmetros fisiológicos.

Com este estudo pôde-se verificar que a determinação de PCR 24 horas após a cirurgia, apenas permitiu confirmar a presença de inflamação pós-cirúrgica. A valorização desta proteína nesta situação não parece ser de grande utilidade na prática clínica, com excepção de casos em que possa haver suspeita do desenvolvimento de um processo infeccioso de origem iatrogénica durante a cirurgia. Assim, a determinação das concentrações séricas de

PCR 24 horas após a cirurgia, como única amostra, não parece trazer grandes vantagens na detecção de infecções cirúrgicas. No entanto, a recolha de diferentes amostras pós-cirúrgicas para detecção de PCR, pode apresentar alguma utilidade na prática clínica, uma vez que vai permitir avaliar a evolução desta proteína, permitindo, assim, diagnosticar a presença de infecções quando os seus valores não seguem o comportamento normal e aumentam ao longo do tempo, ao contrário do que seria de esperar.

Conclusão

A proteína C reactiva é uma das mais importante proteínas de fase aguda da espécie canina. Nos cães, esta proteína pode ser utilizada como um indicador não específico de inflamação ou infecção. A sua concentração sérica está relacionada com a severidade da patologia, podendo a sua quantificação contribuir para determinar a presença e a severidade de determinada alteração, verificar a eficácia de um tratamento, auxiliar no diagnóstico diferencial ou no prognóstico.

O primeiro estudo realizado tinha como objectivo verificar o comportamento da proteína C reactiva após diversas intervenções cirúrgicas, recolhendo amostras de sangue de 15 cães antes, 24 horas e 8 dias depois da cirurgia. Ao utilizar-se um teste destinado a amostras de medicina humana, e devido à ausência de reacções cruzadas entre a proteína C reactiva humana e canina, os valores obtidos foram sempre muito inferiores aos valores de referência, não tendo sido possível retirar qualquer conclusão sobre o comportamento desta proteína.

Assim, realizou-se um segundo estudo clínico com o mesmo objectivo, mas efectuando-se a recolha apenas antes e 24 horas após a cirurgia. Nos dezassete animais utilizados verificou-se um aumento pós-cirúrgico dos valores de PCR proporcional à intensidade de inflamação decorrente da cirurgia. Nesta situação, a valorização das concentrações de PCR apenas reflectiu a existência dum processo inflamatório pós-cirúrgico, não permitindo verificar a existência de eventuais processos infecciosos. Assim, a recolha de amostras sanguíneas 24 horas após a cirurgia, não se reveste de grande utilidade na rotina da prática clínica.

Futuramente, seria de grande interesse realizar um estudo envolvendo um maior número de animais e de recolhas pós-cirúrgicas, para melhor esclarecer as informações que a determinação dos teores séricos de PCR podem fornecer. O estabelecimento do limiar de concentrações de PCR que permitisse distinguir um processo inflamatório de um processo infeccioso, contribuiria para uma melhor rentabilização deste parâmetro laboratorial. Para isso, seria interessante avaliar a concentração sérica de PCR, em pontos temporais determinados, em grupos de animais com idades semelhantes, sem patologia associada, submetidos a cirurgias em que a técnica utilizada fosse constante, como por exemplo, ovariectomia electiva. Assim seria possível diminuir as variações fisiológicas individuais e as decorrentes do trauma cirúrgico, o que permitiria distinguir as alterações relacionadas com um processo inflamatório e com um processo infeccioso.

Em medicina veterinária, as maiores limitações da utilização desta proteína são a baixa especificidade e o elevado custo de cada análise. Este último aspecto será provavelmente em breve ultrapassado, uma vez que existem cada vez mais métodos rápidos para utilizar na área clínica. Futuros estudos poderão contribuir para estabelecer um limite de

positividade que permita discriminar animais com processos inflamatórios, de outros com patologia para além de inflamação de forma a aumentar a especificidade da informação fornecida pela proteína C reactiva.

Ao terminar o estágio curricular e a tese de mestrado integrado posso concluir que a sua realização no Hospital Veterinário do Restelo foi claramente positiva, uma vez que a formação adquirida ao longo dos 6 meses, através do sempre disponível e empenhado corpo clínico e grupo de auxiliares, me permitiram consolidar e aprofundar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Medicina Veterinária.

Bibliografia

- Bharadwaj D., Stein M., Volzer M., Mold C., Du Clos T. W. (1999). The major receptor of C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor II. *The Journal of Experimental Medicine*, 190, 585-590.
- Bienvenu J.m Monneret G., Fabien N., Revillard J. P. (2000). The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 39 (4), 267-285
- Black S. G. (2005). *C-reactive protein: a study of its functional domains using transgenic mice*. Doctor of Philosophy Thesis. Cleveland: Department of Biochemistry, Case Western Reserve University.
- Casals C., Varela A., Ruano M. L. F., Valiño F., Pérez-Gil J., Torre N., Jorge E., Tendillo F, Castillo-Olivares J. (1998). Increase of C-reactive protein and decrease of surfactant protein A in surfactant after lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157, 43-49.
- Caspi D., Baltz M. L., Snel F., Gruys E., Niv D., Batt R. M., Munn E. A., Butress N., Pepys M. B. (1984). Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*, 53, 307-313.
- Ceciliani F., Giordano A., Spagnolo V. (2002). The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and Peptid Letters*, 9, 211-223.
- Chambers R. E., Hutton C. W., Dieppe P. A, Witcher J. T. (1991). Comparative study of C reactive protein and serum amyloid A protein in experimental inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 50, 677-679.
- De Beer F. C., Baltz M. L., Munn E. A., Feinstein A., Taylor J., Bruton C., Clamp J. R., Pepys M. B. (1982). Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology*, 45, 55-70.

- Dela Cruz A. I., Coronel R. F., Torralba T. OP. (2001). The diagnostic use of C-reactive protein in the detection of infection among patients with malignancy and connective tissue disease. *The Philippine journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 30 (3), 108-111.
- Deodhar S. D., James K., Chiang T., Edinger M., Barna B. P. (1982). Inhibition of lung metastases in mice bearing a malignant fibrosarcoma by treatment with liposomes containing human C-reactive protein. *Cancer Research*, 42, 5084-5088.
- Du Clos T. W., Zlock L. T., Rubin R. L. (1988). Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin. *The American Association of Immunologists*, 141, 4266-4270.
- Eckersall P. D. (2006a). Acute phase proteins as biomarkers of disease in companion and laboratory animals. *Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson, Arizona, 2-6 December*.
- Eckersall P. D. (2006b). Acute phase proteins: form, function and analysis. *Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson, Arizona, 2-6 December*.
- Eckersall P. D. (2006c). Measurement of acute phase proteins as biomarkers of disease. *Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson, Arizona, 2-6 December*.
- Ettinger S. J., Feldman E. C. (2000). *Textbook of veterinary internal medicine*. (5th ed.). Philadelphia: Saunders.
- Fransson B. A., Karlstam E., Bergstrom A., Lagerstedt A., Park J. S., Evans M. A., Ragle C. A. (2004). C-reactive protein in the differentiation of piómetra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40, 391-399.

- Fransson B. A., Karlstam E., Lagerstedt A., Bergstrom A., Hagman R., Park J. S., Chew B. P., Evans M. A., Ragle C. A. (2006). C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with piometra and SIRS. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, doi: 10.1111/j. 1476-4431.2006.00203, 1-9.
- Fujise H., Takanami H., Yamamoto M., Ohta I., Yamamoto S., Fukase T., Naiki M., Akihama S., Ogawa E., Takahashi R. (1992). Simple isolation of canine C-reactive protein (CRP) by phosphorylcholine (PC) affinity chromatography. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54 (1), 165-167.
- Gabay C., Kushner I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340, 448-455.
- Gillet A. (2002). *La protein C-reactive chez le chien. Etude bibliographique et essai d'un kit utilisant une technique ELISA* These pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. Lyon: Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
- Gruys E. Toussaint M. J. M., Niewold T. A., Koopmans S. J. (2005a). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*, 6 (11), 1045-1056.
- Hayashi S., Jinbo T., Iguchi K., Shimizu M., Shimada T., Nomura M., Ishida Y., Yamamoto S. (2001). A comparison of the concentrations of C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein in the serum of Young and adult dogs with acute inflammation. *Veterinary Research Communications*, 25, 117-126.
- Hirvonen (2000). *Acute Phase Response in Dairy Cattle*. Thesis. Helsinki: Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.
- Holm J., Rozanski E. A., Freeman L. M., Webster C. R. L. (2004). C-reactive protein concentrations in canine acute pancreatitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14, 183-186.
- Hurter K, Spreng D., Rytz U., Schawalder P., Ott.Knusel F., Schmokel H. (2005). Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 169, 281-285.

- Jinbo T., Ami Y., Suzaki Y., Kobune F., Ro S., Niki M., Iguchi M., Yamamoto S. (1999). Concentrations of C-reactive protein in normal monkeys (*Macaca irus*) and in monkeys inoculated with *Bordetella bronchiseptica* R-5 and measles virus. *Veterinary Research Communications*, 23, 265-274.
- Kallio R. (2000). *Traditional and new markers of infection in adult cancer patients and the possible interfering effect of underlying malignancy in these markers*. Thesis. Oulu: Facult of Medicine, University of Oulu.
- Kjelgaard-Hansen m., Kristensen A. T., Jensen A. L. (2003). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. *Journal of Veterinary Medicine*, 50, 164-168.
- Kjelgaard-Hansen M., Jensen A. L., Houser G. A., Jensen L. R., Kristensen A. T. (2006). Use of serum C-reactive protein as an early biomarker of inflammatory activity in canine type II immune-mediated polyarthritis: case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48 (1), 9.
- Knapp A., Schrodli W., Grevel V., Ochtering G. (2001). Concentrations of serum C-reactive protein (CRP) in dogs with complications in wound healing. *Proceedings of Veterinary World Healing Association, Hannover, Germany, 10-12 May*.
- Kuribayashi T., Shimada T., Matsumoto M., Kawato K., Honjyo T., Fukuyama M., Yamamoto Y., Yamamoto Y. (2003). Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Experimental Animals*, 52 (5), 387-390.
- Kushner I., Feldmann G. (1978). Control of the acute phase response: demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *Journal of Experimental Medicine*, 148, 466-477.
- Liu Q., Djuricin G., Nathan C., Gattuso P., Weinstein R. A., Prinz R. A. (2000). The effect of interleukin-6 on bacterial translocation in acute canine pancreatitis. *International Journal of Pancreology*, 27 (2), 157-165.
- Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I. (2006). *Immunology*. (7th Ed.). NY, Elsevier

- Marnell L., Mold C., Du Clos T. W. (2005). C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical Immunology*, 117, 104-111.
- Martínez-Subiela S., Ginel P. J., Ceron J. J. (2004). Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *The Veterinary Record*, 154, 814-817.
- Martínez-Subiela S., Ceron J. J. (2005a). Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruplasmin assays. *The Canadian Veterinary Journal*, 46 (7), 625-629.
- Martínez Subiela S., Ceron J. J. (2005b). Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. *Veterinární Medicina*, 50, 39-46.
- Matijatko V., Mrljak V., Kis I., Kucer N., Forsek J., Zivcnjak T., Romic Z., Simec Z., Ceron J. J. (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144, 242-250.
- Maudsley S., Pepys M. B. (1987). Immunochemical cross-reactions between pentraxins of different species. *Immunology*, 62, 17-22.
- Mazhar D., Ngan S. (2006). C-reactive protein and colorectal cancer. *Quarterly Journal of Medicine*, 99 (8), 555-559
- McGrotty Y. L., Knottenbelt C. M., Ramsey I. K., Reid S. W. J., Eckersall P. D. (2004). Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Record*, 154, 175-176.
- Mischke R., Waterston M., Eckersall P. D. (2006). Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *The Veterinary Journal*, 174, 188-192.
- Mold C., Rodriguez W., Rodic-Polic B., Du Clos T. W. (2002). C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with FcγR
- Moshage H. (1997). Cytokines and hepatic acute phase response. *Journal of Pathology*, 181, 257-266.

- Murata H., Shimada N., Yoshioka M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168, 28-40.
- Murphy T. M., Baum L. L., Beaman K. D. (1991). Extrahepatic transcription of human C-reactive protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 173, 495-498.
- Nakamura M., Takahashi M., Ohno K., Koshino A., Nakashima K., Setoguchi A., Fujina Y., Tsujimoto H. (2008). C-reactive protein concentration on dogs with various diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70, 127-131.
- Osmand A. P., Friedenson B., Gewurz H., Painter R. H., Hofmann T., Shelton E. (1977). Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous protein displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (2), 739-743.
- Otabe K., Sugimoto T., Jinbo T., Honda M., Kitao S., Hayashi S., Shimizu M., Yamamoto S. (1998). Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Veterinary Research Communications*, 22, 77-85.
- Otabe K., Ito T., Sugimoto T., Tamamoto S. (2000). C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Laboratory Animals*, 34, 434-438.
- Paltrinieri S., (2007). Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase protein. *Veterinary Research Communications*, 31, 125-129.
- Parra M. D., Tecles F., Martínez-Subiela S., Ceron J. J. (2005). C-reactive protein measurement in canine saliva. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 139-144.
- Parra M. D., Tuomola M., Cabezas-Herrera J., Ceron J. J. (2006a). Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Veterinary Research Communications*, 30, 113-126.
- Parra M. D., Papasouliotis K., Ceron J. J. (2006b). Concentrations of C-reactive protein in effusions in dogs. *The Veterinary Record*, 158, 753-757

- Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M. H. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35, 163-187.
- Póvoa (2000). Marcadores da sepsis. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*, 9, 249-250.
- Prescott L., Harley J. P., Klein D. (1999). *Microbiology*. (4th ed.). United States of America: McGraw-Hill.
- Rogowski O., Vered Y., Shapira I., Hirsh M., Zakuf V., Berliner S. (2005). Introducing the wide range C-reactive protein (wr-CRP) into clinical use for the detection of microinflammation. *Clinica Chimica Acta*, 358, 151-158.
- Sasanelli M., Paradies P., Caprariis D., Greco B., Palo P., Palmisano D., Carelli G. (2007). Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Veterinary Research Communications*, 31, 335-338.
- Shimada T., Ishida Y., Shimizu M., Kawato K., Iguchi K., Jinbo T. (2002). Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Research Communications*, 26, 171-177.
- Singh U. K. (1994). Cerebrospinal fluid C-reactive protein in the diagnosis of meningitis in children. *Indian Pediatrics*, 939-942.
- Sjoberg A. P., Trouw L. A., McGrath F. D. G., Hack C. E., Blom A. M. (2006). Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory of C4b-binding protein. *The Journal of Immunology*, 176, 7612-7620.
- Stein M., Mold C., Du Clos T. W. (2000). C-reactive protein binding to murine leucocytes requires Fcγ receptors. *The Journal of immunology*, 164, 1514-1520.
- Suresh M., Singh S. K., Ferguson D. A., Agrawal A. (2007). Human C-reactive protein protects mice from *Streptococcus pneumoniae* infection without binding to pneumococcal C-polysaccharide. *The Journal of Immunology*, 178, 1158-1163.
- Vergobbi J. P. C. (1992). *Contribution a l'étude de l'utilisation clinique de la protéine C-réactive chez le chien*. Thèse pour le Doctorat Veterinaire. Alfort: École Nationale Veterinaire d'Alfort.

- Vigo C. (1985). Effect of C-reactive protein on platelet-activation factor – induced platelet aggregation and membrane stabilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 3418-3422.
- Weinhold B., Ruther U. (1997). Interleukin-6-dependent and –independent regulation of the human C reactive protein gene. *The Journal of Biochemistry*, 327, 425-429.
- Yamamoto S., Miyaji S., Abe N., Otabe K., Furukawa E., Naiki M. (1993a). Canine C-reactive protein (CRP) does not share common antigenicity with human CRP. *Veterinary Research Communications*, 17, 259-266.
- Yamamoto S., Shida T., Miyaji S., Santsuka H., Fujise H., Mukawa K., Furukawa E., Nagae T., Naiki M. (1993b). Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 17, 85-93.
- Yamashita K., Fujinaga T., Miyamoto T., Hagio M., Izumisawa Y., Kotni T. (1994). Canine Acute Phase Response: Relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56 (3), 487-492.

Anexo 1 - protocolo utilizado para determinar a concentração da proteína C reactiva sérica através do método “wide-range immunoturbidometric assay”

ADVIA Chemistry
Systems



04077723 Rev. A

2006-10

Proteína C-reactiva de Intervalo Largo (wrCRP)

Sistema	Informações novas
ADVIA® 1200	Lançamento inicial de métodos combinados
ADVIA 1650/1800	Lançamento inicial de métodos combinados
ADVIA 2400	Lançamento inicial de métodos combinados

NOTA: Para uma explicação dos símbolos apresentados neste documento e nos produtos associados, consulte *Legenda dos símbolos* localizado na página de introdução do directório dos métodos.

Resumo do ensaio

Item	Descrição
Princípio do método	Imunoturbidimetria intensificada por látex
Tipo de amostra	Soro e plasma de origem humana (heparina de lítico)
Estabilidade no sistema	ADVIA 1200: 35 dias
	ADVIA 1650/1800: 35 dias
	ADVIA 2400: 21 dias
Temperatura de armazenamento dos reagentes	2 – 8 °C
Frequência de calibração	ADVIA 1200: 21 dias
	ADVIA 1650/1800: 21 dias
	ADVIA 2400: 21 dias
Frequência do branco de reagente (RBL)	Na altura da calibração do método
Tipo de reacção	2 pontos (EPA)
Medição do comprimento de onda	571 nm
Normalização	Material de referência CRM-470 do IRMM
Intervalo analítico	Sistema
	Soro/Plasma*
	ADVIA 1200 0,002 – (15,6 – 16,4) mg/dl (0,02 – [156 – 164] mg/l)
	ADVIA 1650/1800 0,012 – (15,6 – 16,4) mg/dl (0,12 – [156 – 164] mg/l)
	ADVIA 2400 0,003 – (15,6 – 16,4) mg/dl (0,03 – [156 – 164] mg/l)
	*a concentração de CRP no Calibrador para proteína C-Reactiva de intervalo largo de nível 8 para sistemas bioquímicos ADVIA varia entre 15,6 – 16,4 mg/dl (156 – 164 g/l)

Bayer HealthCare

Português - 1

Item	Descrição
Valores esperados	Adultos: 0 – 0,5 mg/dl (0 – 5,0 mg/l) Recém-nascidos, sangue do cordão umbilical: < 0,06 mg/dl (< 0,6 mg/l) Bebês, 4 dias – 1 mês: < 0,16 mg/dl (< 1,6 mg/l)
Código do reagente	74036
Calibradores	Calibradores para proteína C-reativa de intervalo largo para sistemas bioquímicos ADVIA: REF 00337402 (PN B03-4815-01)
Primeiros controles	Controlos para proteína C-reativa de intervalo largo para sistemas bioquímicos ADVIA: REF 06503050 (PN B03-4817-01)
Segundos controles	Controlos para proteínas específicas para sistemas bioquímicos ADVIA: REF 09931102 (PN B03-4816-01)

Aplicações ¹⁻⁴

Para utilizar no diagnóstico *in vitro* na determinação quantitativa da concentração da proteína C-reativa em soro e plasma de origem humana em sistemas bioquímicos ADVIA. Estas determinações são utilizadas na detecção e avaliação de infecções, lesões de tecidos, situações inflamatórias e doenças associadas. Os aumentos nos valores de CRP não são específicos em muitos processos de doenças e não devem ser interpretados sem uma avaliação clínica completa.

Este método é referido como CRP (wrCRP) de intervalo largo, devido ao intervalo analítico relativamente largo que pode ser medido.

Resumo e explicação

O método mede a wrCRP no soro e plasma utilizando um ensaio imunoturbidimétrico intensificado por látex. Baseia-se no princípio de que a concentração do analito é função da intensidade da dispersão de luz originada por agregados de látex. As partículas de látex revestidas com anti-CRP aglutinam-se rapidamente na presença da solução de conjugado da Proteína C-reativa formando agregados.

Princípios do procedimento

O reagente de látex wrCRP é uma suspensão de partículas de látex de poliestireno revestidas com anticorpo anti-CRP. Quando a CRP contendo soro ou plasma é misturada com o reagente de látex, ocorre a aglutinação que resulta num aumento da turbidez. Esta turbidez é medida a 571 nm. A concentração de CRP no soro ou plasma é determinada através de uma curva de calibração gerada com os calibradores.

Reagentes

Os reagentes são embalados conforme indicado a seguir. Os componentes da embalagem só estão disponíveis como um conjunto.

REF (PN) Tamanho da embalagem	Símbolo	Conteúdo	Aproximação	N.º de testes
03108390		Reagentes para a Intervalo Largo		2 x 220
20 ml		Reagente 1	2 x 12.0 ml	
20 ml		Reagente 2	2 x 12.0 ml	
00829585		Reagentes para a Proteína C-reativa de Intervalo Largo		7 x 315
20 ml		Reagente 1	7 x 12 ml	
20 ml		Reagente 2	7 x 12 ml	

Componentes e concentrações

Reagente	Componente	Concentração
Reagente 1	Glicina	170 mmol/L
	Clorato de sódio	100 mmol/L
	EDTA sódico, sal dissódico, dihidrato	50 mmol/L
	Azida sódica	0,09% w/v
Reagente 2	Anticorpo anti-CRP (coelho) - látex sintético	Especificidade do lote
	Azida sódica	0,09% w/v

PRECAUÇÃO: Este dispositivo contém material de origem animal, devendo ser manuseado como potencial portador e transmissor de doenças.

NOTA: A azida sódica pode reagir com o cobre e o chumbo existentes nas canalizações, formando azidas metálicas explosivas. Quando eliminados os reagentes, se a eliminação desses materiais através da rede de esgotos cumprir a legislação em vigor, utilize água em abundância, para evitar a acumulação de azidas.

Para utilizar no diagnóstico *in vitro*.

Preparação e utilização dos reagentes

Os reagentes estão prontos a usar. Agite suavemente o reagente antes de utilizar, para eliminar as bolhas e garantir a homogeneidade.

Anexo 2 - valores obtidos nas análises hematológicas no primeiro estudo clínico

Tabela 17: Valores do hemograma e bioquímicas de rotina referentes aos animais do primeiro estudo clínico.

Animal	GB	GV	PLA	BUN	CREA	ALP	ALT	PT	GLU
1	19,78	6,01	30,1	37	25	95	63	69	97
2	20,80	5,77	26,2	64	26	49	49	63	95
3	14,05	5,95	27,0	15	14	54	57	69	134
4	16,31	6,13	18,9	14	12	48	48	67	103
5	17,01	5,78	23,9	31	15	128	101	60	97
6	8,94	5,58	40,5	14	8	35	42	63	81
7	7,11	5,54	32,5	11	11	62	51	70	99
8	11,39	5,54	16,8	15	14	101	89	68	98
9	5,70	7,20	14,6	11	7	43	57	65	102
10	13,55	10,63	43,1	13	12	58	74	64	93
11	29,90	5,32	31,2	7	19	43	32	93	135
12	29,78	5,62	13,5	15	5	45	12	54	90
13	14,05	5,83	25,5	14	11	49	18	64	110
14	25,54	3,48	18,3	15	15	83	95	69	140
15	18,95	7,04	34,7	17	12	150	32	73	141

GB – glóbulos brancos - $6-17 \times 10^3/\mu\text{L}$; GV – glóbulos vermelhos - $5,5-8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$; PLA – plaquetas - $12-60 \times 10^4/\mu\text{L}$; BUN – ureia - $<16 \text{ mg/dl}$; CREA – creatinina - $<2 \times 10 \text{ cg/dl}$; ALP – fosfatase alcalina - $<147 \text{ UI/L}$; ALT – alanina transaminase - $<120 \text{ UI/L}$; PT – proteínas totais - $60-80 \text{ dg/dl}$; GLU – Glucose - $40-150 \text{ mg/dl}$

As células sombreadas indicam os valores que se encontram acima ou abaixo dos limites de referência.

Anexo 3 - valores das concentrações séricas de PCR no primeiro estudo clínico

Tabela 18: Concentrações séricas da proteína C reactiva nos animais do 1º estudo clínico

Animal	T₀	T₁	T₂
1	0,19	0,12	0,01
2	0,03	0,08	0,04
3	0,01	0,01	0,01
4	0,01	0,01	0,01
5	0,07	0,06	0,08
6	0,02	0,06	0,01
7	0,01	0,02	0,01
8	0,01	0,12	0,01
9	0,01	0,03	0,01
10	0,01	0,01	0,01
11	0,04	0,03	0,05
12	0,01	0,03	0,01
13	0,01	0,12	0,01
14	0,01	0,02	0,01
15	0,01	0,04	0,01

Unidades em µg/ml. Valores de referência: 1,1-6,3 µg/ml

Anexo 4 - protocolo utilizado para determinar a concentração da proteína C reactiva sérica através do método ELISA

PHASE™ RANGE

Canine C-Reactive Protein Assay
(Cat No: TP-903)

Intended use

The activation of the body's immune system-mediated defence mechanisms is termed the acute phase response. Activation can occur due to infections, inflammation, tissue injury, neoplastic growth or immunological disorders. This assay is designed to detect the acute phase protein, C-Reactive protein, from the serum of dogs.

Note: This product is for research purposes only.

Introduction

C-Reactive Protein is one of the family of acute phase proteins found in the blood of both humans and animals. Under normal conditions it is found in low levels in the blood but can increase significantly in response to inflammatory conditions, infections and other disease states where tissue necrosis occurs, and therefore provides a highly sensitive indicator for these conditions.

Assay principle

The Tridelita Phase™ range canine CRP kit is a solid phase sandwich Immunoassay. Samples, including calibrators of known CRP content bind to coated microwells. After washing to remove any unbound material the HRP labeled Anti-canine-CRP antibody is added to each well. After again washing to remove any unbound material TMB substrate solution is added. The intensity of the colour produced is proportional to the concentration of CRP present in the original specimen.

Components Supplied

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 1. Coated microplate | 1 x 96 well plate |
| 2. C-Reactive protein calibrator | 1 x 1.5ml (Ready to use) |
| 3. Standard/sample diluent buffer | 1 x 50ml (20x concentrate) |
| 4. Anti-canine CRP Conjugate | 1 x 11ml (Ready to use) |
| 5. Wash concentrate | 1 x 50ml (20x concentrate) |
| 6. TMB Substrate | 1 x 11ml (Ready to use) |
| 7. Stop solution | 1 x 11ml (Ready to use) |
| 8. Information leaflet | 1 |

Additional materials required

1. Serum collection equipment.
2. Microtiter plate reader capable of measurement at 450nm with reference at 630nm if available.
3. Accurate micropipettes and disposable tips to deliver 0-10µl, 20-200µl and 200-1000µl.
4. A repeat or multichannel pipette (50-200µl) for large assays.
5. Deionized or distilled H₂O.
6. Plate washer (automated or manual).
7. Graph paper: Standard or semi-log.
8. Glass or plastic test tubes.
9. Absorbent paper towels.
10. 96 well dust plate cover.
11. 37°C incubator.
12. Timer

Storage and Stability

The kit components are stable when stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the kit label.

Safety

- Never pipette by mouth.
- Wear disposable latex gloves and eye protection where appropriate.
- The stop solution and TMB substrate contain reagents that may irritate the skin or mucous membranes. Any reagent, which comes into contact with the skin, should be washed off with water immediately.

Sample Preparation

Samples

Specimens should be collected by venipuncture into serum collection tubes. Blood samples may be kept for up to 24 hours before separation of serum. However, it is best to remove serum from the clot as soon as possible after collection. In general, serum may be stored at 2-8°C for up to 24 hours or stored frozen at -20°C for longer periods without loss of CRP. It is important that all refrigerated samples are brought to room temperature and mixed to assure accurate determination of the CRP concentration.

All samples should be diluted 1:500 in sample diluent buffer (1x) prior to assay by addition of 10ul of sample to 5.0 ml diluent buffer (1x).

Do not use grossly haemolysed or lipaemic samples.

Reagent Preparation

Diluent Buffer (1x)

Dilute 1 volume of diluent buffer concentrate (20x) with 19 volumes of distilled water. Store the diluent buffer concentrate and working diluent buffer (1x) in the refrigerator. Diluted buffer is stable for up to 2 weeks when stored at 4°C.

Wash Buffer (1x)

Dilute 1 volume of wash buffer concentrate (20x) with 19 volumes of distilled water. Store the wash buffer concentrate and working wash buffer (1x) in the refrigerator. Diluted solution is stable for up to 2 weeks when stored at 4°C.

Calibration curve preparation

Label 6 tubes C1 to C6. To prepare the top calibrator, add 250µl of the calibrator supplied in the kit to tube C1 (see table 1). Add 250µl 1x diluent buffer to each of the remaining tubes (C6) as directed in table 1. The top calibrator is serially diluted 4 times (tubes C2 to C5) to produce the working calibrators as indicated in table 1 below. Tube C6 constitutes the assay blank and contains 1x diluent buffer only.

Table 1: Preparation of working calibration curve

C1 (Top calibrator)	50µg/ml	25µg/ml	12.5µg/ml	6.25µg/ml	3.125µg/ml
C1	50µg/ml	25µg/ml	12.5µg/ml	6.25µg/ml	3.125µg/ml
C2	25µg/ml	12.5µg/ml	6.25µg/ml	3.125µg/ml	1.562µg/ml
C3	12.5µg/ml	6.25µg/ml	3.125µg/ml	1.562µg/ml	0.781µg/ml
C4	6.25µg/ml	3.125µg/ml	1.562µg/ml	0.781µg/ml	0.390µg/ml
C5	3.125µg/ml	1.562µg/ml	0.781µg/ml	0.390µg/ml	0.195µg/ml
C6 (Blank)	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank

The range provided represents a CRP concentration of 3.75 – 60µg/ml when a dilution of 1:500 is taken into account.